

***Herpesvirus saimiri* basierte Vektoren für die somatische
Gentherapie der Rheumatoiden Arthritis**



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaft (Dr. rer. nat.)
der naturwissenschaftlichen Fakultät IV
Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Carsten Wieser
aus Nürnberg
2004

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von August 2000 bis April 2004 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. B. Fleckenstein und PD Dr. A. Ensser am Institut für Klinische und Molekulare Virologie der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg.

Promotionsgesuch eingereicht am: 27.04.2004

Tag der mündlichen Prüfung: 09.06.2004

Die Arbeit wurde geleitet von
Prof. Dr. A. Buschauer
PD Dr. A. Ensser

Prüfungsausschuß:
Prof. Dr. S. Elz (Vorsitz)
Prof. Dr. A. Buschauer
PD Dr. A. Ensser
Prof. Dr. A. Göpferich

Für Christiane und Chiara

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
1. <i>Herpesvirus saimiri</i>	1
2. Ansätze zur Gentherapie.....	2
3. Rheumatoide Arthritis.....	4
3.1. Das Gelenk.....	4
3.2. Krankheitsbild und Pathogenese.....	4
3.3. Therapie.....	7
 II. Ziel der Arbeit.....	 9
 III. Material und Methoden.....	 10
1. Material.....	10
1.1. Chemikalien.....	10
1.2. Puffer und Lösungen.....	12
1.3. Größenmarker für Gelelektrophorese.....	12
1.4. Biologisches Material.....	13
1.5. Cosmide, Plasmide und Vektorsysteme.....	15
1.6. Oligonukleotide, Real-time PCR und Southern Blot Sonden.....	17
1.7. Antikörper, Antikörper-Kits und Nachweisreagenzien.....	18
1.7.1. Antikörper.....	18
1.7.2. Antikörper-Kits und Nachweisreagenzien.....	19
1.8. Enzyme.....	20
1.9. Software.....	20
2. Methoden.....	21
2.1. Virus- und Zellkulturverfahren.....	21
2.1.1. Kultivierung von Zellen.....	21
2.1.2. Transfektion von Cosmiden in OMK und 293T-Switch Zellen.....	21
2.1.3. Herstellung und Isolierung von <i>Herpesvirus saimiri</i> Vektoren.....	21
2.1.4. Vermehrung und Virustiterbestimmung von <i>Herpesvirus saimiri</i> Vektoren.....	21
2.1.5. Infektions- und Induktionsversuche mit <i>Herpesvirus saimiri</i> Vektoren.....	22
2.2. Nukleinsäure-Methoden.....	22
2.2.1. Standardmethoden.....	22
2.2.2. Aufreinigung viraler DNA aus Zellkulturüberständen.....	23
2.2.3. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	23
2.2.4. Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR).....	24
2.2.5. Quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	24

2.2.6. Bisulfit-Sequenzierung.....	25
2.2.7. Southern Blot.....	27
2.3. Proteinmethoden und immunologische Verfahren.....	27
2.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	27
2.3.2. Immunadsorptionstest (ELISA).....	28
2.3.3. Durchflußzytometrie (FACS).....	29
2.3.4. Immunfluoreszenz.....	29
2.3.5. Simultane Detektion membrangebundener Zytokine.....	30
IV. Ergebnisse.....	31
1. Insertion regulierter therapeutischer Gene in Cosmide.....	31
1.1. Cosmide für die regulierte Genexpression mit attenuierten Vektoren.....	31
1.2. Überprüfung der Cosmide des induzierbaren Expressionssystems.....	34
1.2.1. Restriktionsenzymverdau.....	34
1.2.2. Induzierbare Interleukinexpression.....	35
2. Rekombinante <i>Herpesvirus saimiri</i> Vektoren.....	36
2.1. Darstellung der rekombinanten Vektoren.....	36
2.2. Überprüfung der rekombinanten Vektoren.....	37
2.2.1. Gesamtlänge der viralen L-DNA.....	37
2.2.2. Homologe Rekombination.....	37
2.2.3. Präsenz der Interleukinkassetten.....	39
2.2.4. Funktion der induzierbaren Vektoren in OMK Zellen	40
2.2.4.1. Interleukinexpression in OMK Zellen	40
2.2.4.2. Das GeneSwitch™-Protein in OMK Zellen	41
3. Untersuchungen zur Selektivität und Sensitivität des induzierbaren Expressions- systems im viralen Kontext.....	41
3.1. Selektivität in OMK und HFF Zellen.....	41
3.2. Sensitivität in OMK und HFF Zellen.....	43
4. Untersuchungen zur induzierbaren Interleukinexpression der Vektoren in humanen Fibroblasten.....	45
4.1. Induzierbare Interleukinexpression in HFF Zellen.....	45
4.1.1. Zeitverlauf der Interleukinexpression.....	45
4.1.2. Expression des GeneSwitch™-Proteins.....	45
4.1.3. Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis.....	46
4.2. Induzierbare Interleukinexpression in RASF Zellen	47
4.2.1. Zeitverlauf der Interleukinexpression.....	47

4.2.2. Korrelation von Interleukinexpression und Virusmenge, sowie Einfluß zellulärer Parameter.....	48
4.2.3. RT-PCR.....	49
5. Reinduzierbarkeit des induzierbaren Systems <i>in vitro</i>	50
5.1. Interleukinexpression in humanen Fibroblasten.....	50
5.2. Bildung des GeneSwitch™-Proteins.....	52
6. Problematik der sekundär induzierten Interleukinexpression	54
6.1. Vektorpersistenz in humanen Fibroblasten.....	54
6.2. Promotoren zur GeneSwitch™-Protein Expression.....	55
6.3. Methylierung der GAL4UAS Zielsequenzen des GeneSwitch™-Proteins.....	59
6.3.1. Bisulfit-Sequenzierung	59
6.3.2. 5'-Azacytidin Behandlung.....	62
7. In vitro Funktion der Vektoren.....	63
7.1. Reduktion der IL-1 β stimulierten MMP-3 Expression.....	63
7.2. Einfluß der Vektoren auf die Expression verschiedener Zytokine.....	64
7.3. Zelluläre ICAM-1 und THY-1 Expression.....	65
V. Diskussion.....	66
VI. Zusammenfassung.....	72
VII. Abkürzungen.....	73
VIII. Referenzen	75
IX. Publikationen	82
X. Anhang	83

I. Einleitung

1. *Herpesvirus saimiri*



Der Begriff Herpesvirus leitet sich vom griechischen „herpein“ ab, das mit „schleichen, kriechen“ übersetzt werden kann und sich auf die chronisch, latente und rezidivierende Art der Infektion bezieht. Die Virusfamilie der Herpesviren (*Herpesviridae*) unterteilt sich in drei Unterfamilien. Zum einen in α -Herpesviren (α -*Herpesvirinae*) mit ihren bekannten Vertretern den Herpes-simplex-Viren und dem Varicella-Zoster-Virus und zum anderen in β -Herpesviren (β -*Herpesvirinae*), zu denen das humane Cytomegalievirus gehört. Die dritte Unterfamilie der lymphotropen γ -Herpesviren (γ -*Herpesvirinae*) lässt sich wiederum in zwei Subfamilien differenzieren, nämlich in Lymphocryptoviren (γ 1-*Herpesvirinae*), mit ihrem wohl bekanntesten Repräsentanten dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und in Rhadinoviren (γ 2-*Herpesvirinae*), zu denen *Herpesvirus saimiri* (*saimiriine herpesvirus* 2, HVS) (Melendez *et al.*, 1968), wie auch das human-pathogene Herpesvirus 8 (Kaposi-sarcoma-Herpesvirus, KSHV) zuzuordnen ist. In seinem natürlichen Wirt, dem Totenkopffäffchen (*Saimiri sciureus*, siehe Foto), persistiert HVS apathogen, während es in anderen Neuweltaffen wie Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*), Tamarinen (*Sanguinus ssp.*) und Klammeraffen (*Ateles geoffroyi*) zu akuten T-Zell-Lymphomen und lymphatischen Leukämien führt (Fleckenstein und Desrosiers 1982). Aufgrund von pathogenem Potential und Sequenzvariabilitäten unterscheidet man die Subgruppen A, B und C. Nur Stämme der Subgruppe C sind in der Lage, humane T-Zellen zu transformieren (Biesinger und Fleckenstein 1992), wobei die Onkogene *StpC* und *Tip* essentiell sind (Duboise *et al.*, 1998). Das Genom von HVS besteht aus doppelsträngiger DNA von ca. 155kb Länge und unterteilt sich in einen G+C armen, kodierenden Bereich (L-DNA), der von G+C reichen, nicht-kodierenden Regionen flankiert wird (H-DNA). HVS wurde erstmals von Desrosiers als viraler Vektor eingesetzt, der T-Zellen von Weißbüschelaffen mit bovines Wachstumshormon (bGH) produzierenden HVS-Vektoren infizierte (Desrosiers *et al.*, 1985). Weitere Studien (Desrosiers *et al.*, 1984; Grassmann und Fleckenstein 1989) zeigten die Vorteile von HVS-basierten Vektoren auf: i) Die hohe Klonierungskapazität mit der Möglichkeit auch große Fremdgene in das virale Genom zu inserieren. ii) Die Möglichkeit verschiedenste Zelltypen zu infizieren, unter anderem auch sich nicht mehr teilende Zellen. iii) Die langfristige episomale Persistenz. Dies wurde in später durchgeführten Untersuchungen mit HVS

Vektoren, welche Markergene stabil exprimierten, bestätigt (Frolova-Jones *et al.*, 2000; Stevenson *et al.*, 1999; Stevenson *et al.*, 2000b; Stevenson *et al.*, 2000a). HVS-Vektoren stellen somit eine interessante Alternative zu bisher etablierten Vektortypen dar, wobei eine weitere Charakterisierung und Fortentwicklung für therapeutische Einsätze unabdingbar ist.

2. Ansätze zur Gentherapie

Ursprünglich verstand man unter dem Begriff der Gentherapie die Kompensation eines monogenen Gendefekts durch das Einbringen eines intakten Gens in den Zellkern (Friedmann und Roblin 1972). Diese Sichtweise veränderte sich jedoch im Laufe der Zeit, so daß heute auch die Behandlung von durch herkömmliche Therapie nicht oder nur ungenügend behandelbaren Erkrankungen erwogen wird. Dabei wurde auch der Begriff der Gentherapie neu geprägt und erweitert. Heute umfaßt er das Einbringen von Nukleinsäuren in menschliche Zellen, Gewebe oder Organe, um Gendefekte zu korrigieren oder neue therapeutische Funktionen auszuüben. Eingriffe in die Keimbahn mit der Möglichkeit der Weitergabe gezielt veränderter Erbinformation an nachfolgende Generationen stehen dagegen unter erheblichen ethischen Bedenken. Des Weiteren erfordern viele Erkrankungen die Möglichkeit, die Expression der für lange Zeit eingebrachten Gene zu steuern. Dabei erwies sich der Einsatz regulierbarer eukaryoter Genexpressionssysteme als hilfreich. Grundlegend für viele dieser Systeme sind regulierbare Transaktivatorproteine oder Repressoren. Diese werden nach Bindung einer niedermolekularen Induktionssubstanz aktiviert bzw. deaktiviert und so die Expression des Zielgens kontrolliert. Das bekannteste System stellt hierbei das Tetracyclin gesteuerte (Tet-) System dar, das in verschiedenen Modifikationen vorkommt (Gossen und Bujard 1992). Eine Alternative bietet das 1994 entwickelte GeneSwitch™-System (Fig. 1), bei dem das GeneSwitch™-Protein als Ligand-abhängiger Transkriptionsfaktor fungiert (Wang *et al.*, 1994). Es ist ein 73kDa großes Fusionsprotein, das aus drei Domänen besteht: i) Einer GAL4-DNA-Bindungsdomäne (GAL4DBD) aus *Saccharomyces cerevisiae* (weiß), welche die DNA-Bindung an spezifische sogenannte GAL4-Upstream Activating Sequences vermittelt (GAL4UAS, schwarz). ii) Einer humanen Progesteronrezeptor-Ligand-bindende Domäne (hPR-LBD, rot), die einem C-terminal verkürzten Progesteronrezeptor entspricht und nur noch die Bindung von Progesteronantagonisten, wie z.B. Mifepriston (blau), erlaubt (Wang *et al.*, 1994). iii) Der starken Transaktivierungsdomäne p65 aus dem humanen Transkriptionsfaktor NFκB (p65-AD, grün), welche die Expression des jeweiligen Zielgens aktiviert (hier IL-1 Rezeptor Antagonist, IL-10 oder IL-13, gelb). Diesem regulatorischen Fusionsprotein vorangestellt, ist ein Hybridpromotor aus 4 GAL4-Upstream Activating Sequence Einheiten (GAL4UAS) und einem verkürzten Minimalpromotor der Thymidinkinase von *Herpesvirus simplex* (Tk).

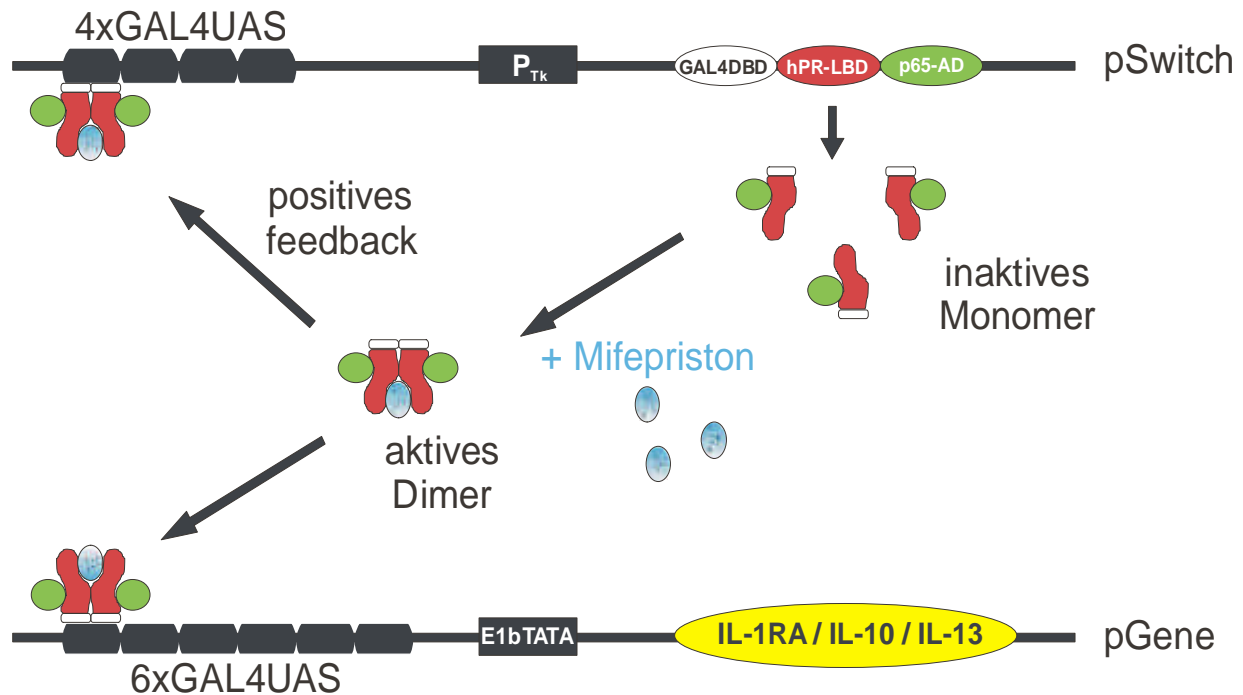


Abb. 1: Übersicht über das GeneSwitch™-System. Das regulatorische pSwitch Plasmid kodiert das aus drei Domänen bestehende GeneSwitch™-Transaktivatorprotein (Oben). Das pGene Plasmid enthält das Zielgen (Unten). Eine geringe Menge an GeneSwitch™-Protein wird auch im Ruhezustand gebildet, liegt allerdings nur in der inaktiven monomeren Form vor. Durch die Zugabe des Induktors Mifepriston erfolgt die Aktivierung und Dimerisierung. Dadurch ist die Bindung an die GAL4-*Upstream Activating Sequences* (GAL4UAS) möglich, und es erfolgt die Expression des Zielgens (hier die Interleukine IL-1 Rezeptor Antagonist, IL-10 oder IL-13; gelb dargestellt). Die Besonderheit dieses Systems ist der positive Rückkopplungsmechanismus, der zur gesteigerten Bildung des GeneSwitch™-Proteins führt.

Das pGene Plasmid enthält den regulierbaren Promotor aus sechs GAL4UAS Einheiten und einer adenoviralen E1b TATA-Box. Das Zielgen (gelb) kann über eine *Multiple Cloning Site* ins Plasmid inseriert werden. Im Ruhezustand wird eine geringe Menge an GeneSwitch™-Protein gebildet. Dies liegt jedoch im inaktiven monomeren Zustand vor, wird erst nach Zugabe von Mifepriston (blau) aktiviert und dimerisiert. In diesem aktiven Zustand erfolgt die Bindung an die GAL4UAS Einheiten. Im pGene Plasmid führt dies zur Expression des Zielgens (gelb). Im pSwitch Plasmid resultiert hieraus ein positiver Rückkopplungsmechanismus und somit eine gesteigerte Bildung des GeneSwitch™-Proteins selbst (Valentis Inc. 2004). Bisherige Studien, die zum Teil auch im adenoviralen Kontext durchgeführt wurden, belegen anschaulich die Funktionsfähigkeit des Systems (Burcin *et al.*, 1998; Burcin *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999).

3. Rheumatoide Arthritis

3.1. Das Gelenk

„Echte Gelenke“, sogenannte Diarthrosen, gewährleisten die Beweglichkeit zweier oder mehrerer Knochen zueinander (Abb. 2). Zwischen den knorpelüberzogenen Gelenkflächen befindet sich der Gelenkspalt, der die viskose Gelenkschmiere (Synovia) enthält. Umschlossen wird das Gelenk von der aus zwei Schichten bestehenden Gelenkkapsel. Die Außenseite der Gelenkkapsel bildet die aus Kollagenfasern aufgebaute *Membrana fibrosa*. An der Innenseite befindet sich die Synovialmembran (*Membrana synovialis*), die zwischen 1-3 Zellschichten dick ist und aus zwei unterschiedlichen Zellarten besteht: Den synovialen Makrophagen (Synoviozyten Typ A) und den synovialen Fibroblasten (Synoviozyten Typ B). Die synovialen Makrophagen besitzen phagozytotische Eigenschaften und können als Antigen präsentierende Zellen fungieren. In erster Linie dienen sie zur Beseitigung von Zelltrümmern, toten Zellen und eingedrungenen Mikroorganismen. Die synovialen Fibroblasten hingegen bilden die hyaluronsäurehaltige Synovia und versorgen den Gelenkinnenraum sowie den Knorpel mit Nährstoffen. Außerdem sind sie an Umbauprozessen infolge kleinerer Knorpelverletzungen beteiligt, die aus der alltäglichen mechanischen Belastung des Knorpels resultieren. Knorpel fungiert als Stoßdämpfer zwischen Gelenkkopf und Gelenkpfanne und besteht im Wesentlichen aus einer Matrix aus Kollagen und Glykosaminoglykanen, in die vereinzelt die für den Auf- und Abbau dieser Matrix verantwortlichen Chondrozyten eingebettet sind. Die Versorgung des gefäßlosen Knorpels erfolgt komplett über die Synovia, wobei sogenannte „Einwalkungsprozesse“ infolge regelmäßiger Be- und Entlastung eine wesentliche Grundlage für die Verteilung der nährstoffreichen Synovialflüssigkeit darstellen.

3.2. Krankheitsbild und Pathogenese

Das Krankheitsbild der Rheumatoiden Arthritis (RA), auch chronische Polyarthritis oder kurz cP genannt, stellt eine chronische entzündliche Gelenkerkrankung meist mehrerer Gelenke unter Einbindung aller Gelenkstrukturen dar, die zur progressiven Destruktion der betroffenen Gelenke führt. Der Beginn der Erkrankung äußert sich mit allgemeinen Krankheitssymptomen wie Müdigkeit, Gewichtsverlust, Kraftlosigkeit und leichtem Fieber. Im Frühstadium treten dann, jeweils symmetrisch an den betroffenen Gelenken, Schwellungen, Schmerzen und Morgensteifigkeit auf. Hierbei sind vor allem die Finger-, Hand- und Kniegelenke involviert. Der Krankheitsprozeß steigert sich meist schubweise und ist im Spätstadium durch typische Gelenkdeformationen charakterisiert, wobei in diesem Zusammenhang nur einige Deformationen der Hand, wie z.B. Schwanenhals-, Knopflochdeformation und 90/90 Deformität des Daumens, erwähnt seien. Auch eine extra-artikuläre Ausweitung z.B. in Form einer Episkleritis, Perikarditis, Pleuritis, Vaskulitis etc.

kann beobachtet werden. Die RA tritt bei ca. 0,5-1% der Weltbevölkerung meist im Alter zwischen 40 und 70 Jahren auf, wobei Frauen dreimal häufiger erkranken als Männer (Lee und Weinblatt 2001). Am Ende der Erkrankung steht nicht selten die totale Zerstörung und Versteifung der betroffenen Gelenke, was durch heutige Therapieoptionen oftmals nur verlangsamt werden kann.

Eine charakteristische Gelenkveränderung ist die synoviale Hyperplasie infolge gesteigerter Proliferation der synovialen Fibroblasten (Abb. 2, rechts). Daraus resultiert auch die sogenannte Pannusbildung, worunter man die Auflagerung und Invasion des proliferierenden Synovialgewebes auf bzw. in den Knorpel versteht. Ursächlich für die gesteigerte Zellproliferation sind vermutlich eine gestörte Expression von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, eine verringerte Apoptose (Franz *et al.*, 2000) und die erhöhte Synthese bestimmter Wachstumsfaktoren (Keyszer *et al.*, 1995).

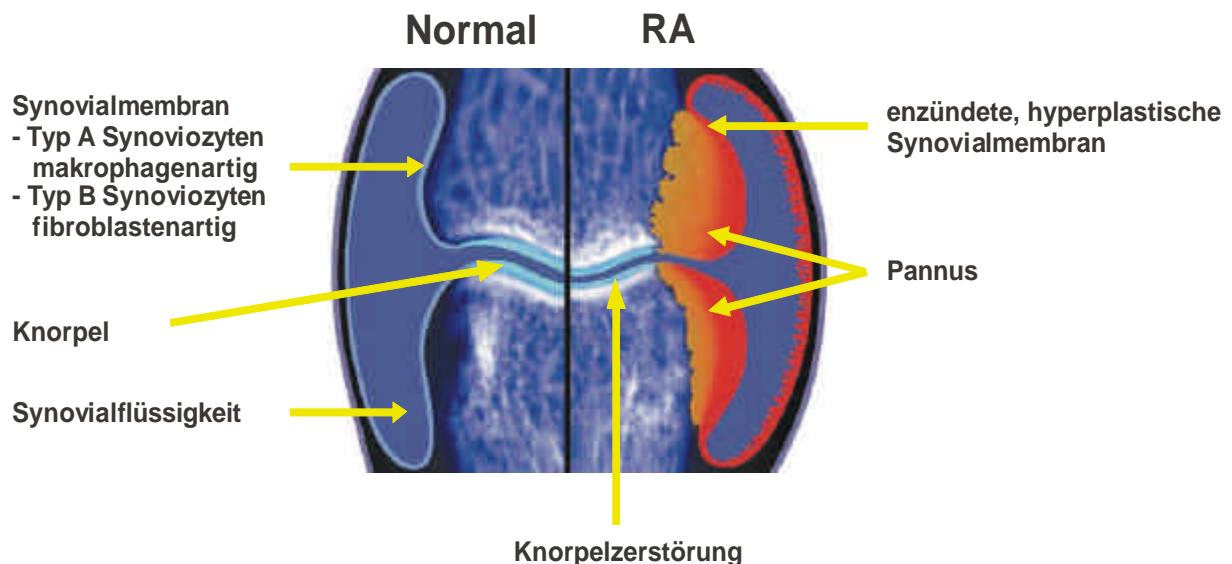


Abb. 2: Typische Gelenkveränderungen der Rheumatoiden Arthritis am Beispiel des Kniegelenks. Links ist ein normales, gesundes Gelenk, rechts ein pathologisch verändertes Gelenk im Zustand der rheumatoiden Arthritis dargestellt. Darstellung basierend auf Feldmann *et al.*, 1996.

Bei der Auflagerung des Gewebes auf den Knorpel sind vermutlich auch Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1, ICAM-1, ICAM-3 und CD44 beteiligt, die verstärkt exprimiert werden (Neidhart *et al.*, 2000; Seemayer *et al.*, 2003). Adhäsionsmoleküle sind zusammen mit der zunehmenden Vaskularisierung und verschiedenen Chemokinen auch bei der gesteigerten Einwanderung von Entzündungszellen in das betroffene Synovialgewebe beteiligt, (Franz *et al.*, 1998; McInnes *et al.*, 1996). Dieses Phänomen führt zum typischen Zytokinungleichgewicht der RA, bei dem letztlich pro-inflammatorische Zytokine aus Synoviozyten, Makrophagen und T-Zellen überwiegen. Hauptmediatoren des Entzündungsgeschehens sind hierbei vor allem $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ (Arend 2001; Choy und Panayi 2001; Feldmann *et al.*, 1996). Diese wirken auch stimulierend auf die Transkription der ebenfalls von den synovialen

Fibroblasten sezernierten Matrixmetalloproteinasen (MMP). Matrixmetalloproteinasen, wie z.B. Kollagenase-1 (MMP-1) und Stromelysin-1 (MMP-3), sind Zink-abhängige Endopeptidasen und physiologisch an Reparatur- und Umbauprozessen des Knorpels beteiligt. Bei der RA übernehmen sie jedoch neben Serinproteasen und Aggrecanasen die zentrale Rolle bei der Destruktion des Knorpels (Feldmann *et al.*, 1996; Gay *et al.*, 1993). Im Anschluß an die Destruktion des Knorpels wird auch der darunterliegende Knochen angegriffen und zerstört.

Trotz dieser Erkenntnisse sind die genauen Entstehungsmechanismen der rheumatoiden Arthritis bislang weitgehend ungeklärt. Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden hierzu verschiedene Modellvorstellungen entwickelt. Das Vorhandensein von Autoantikörpern im Serum von RA-Patienten, sogenannter Rheumafaktor (RF), die gegen den Fc Teil von IgG gerichtet sind, führte zunächst zur Immunkomplextheorie. Diese geht von einer Autoimmunerkrankung als Ursache der rheumatoiden Arthritis aus. Da RF jedoch nicht bei allen RA-Patienten nachweisbar und nicht krankheitsspezifisch ist, konnte RF nicht allein ausschlaggebend für die Pathogenese der RA sein. In kommenden Jahren wurde bei RA-Patienten eine signifikante Häufung der Expression der HLA-Allele DRB1*0101, DRB1*0401 und DRB1*0404 gefunden, was zum Modell des T-Zell-vermittelten Ursprungs der RA führte. Grundlegend hierbei ist eine „*shared epitope*“ genannte Aminosäuresequenz (QK(R)RAA) in der β -Kette des HLA-Moleküls. Für diese werden z.B. die Beteiligung bei der Antigenpräsentation an CD4⁺ T-Zellen, eine direkte Selektion des T-Zell-Repertoires oder die Bindung eines exogenen Peptids diskutiert. Der Nachweis eines korrespondierenden, daraus resultierenden, RA-spezifischen T-Zell-Repertoires fehlt jedoch bislang, trotz der Identifizierung einer Vielzahl möglicher Autoantigene (Typ II Kollagen, Proteoglykane, Aggrecan etc.). Zur Untermauerung der Hypothese eines vorwiegend T-Zell vermittelten Mechanismus wurde im RA-Synovium und der Synovialflüssigkeit nach spezifischen T-Zell-Zytokinen, wie z.B. IL-2 und IFN- γ , gesucht. Diese finden sich jedoch dort nur in relativ geringen Mengen, während von Makrophagen und Fibroblasten sezernierte Zytokine, wie z.B. IL-1, IL-6 und TNF α , überwiegen. Diese Tatsache und die synoviale Hyperplasie führten zur der Theorie, daß die synovialen Fibroblasten alle weiteren Prozesse auslösen und somit die Ursache der RA darstellen (Burkhardt und Möller 2003; Firestein 2003).

Bis heute ist ungeklärt, in welchem Ausmaß genetische Prädisposition, infektiöse Ereignisse und andere Umweltfaktoren bei der Pathogenese der RA eine Rolle spielen. Es wird jedoch im Allgemeinen von einem multifaktoriellen Zusammenwirken als Ursache der RA ausgegangen.

3.3. Therapie

Die medikamentöse Therapie der RA basiert im Wesentlichen auf einer Kombination von nicht-steroidalen Antirheumatika (NSARs) und krankheits-modifizierenden Medikamenten (*Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs, DMARD*), wie z.B. Methotrexat, Sulfasalazin, Leflunomid oder Hydroxychloroquin und Glucocorticoiden. Auch die nicht-pharmakologische Behandlung in Form von Patientenschulung und Ergotherapie spielt eine wesentliche Rolle beim Erreichen des Therapieziels, nämlich den Krankheitsprozeß zu verlangsamen und die Gelenkfunktion zu erhalten.

Die Auswahl des DMARD erfolgt dabei nach Aggressivität der Erkrankung und eventuellen Kontraindikationen. Spätestens nach drei Monaten Behandlungsdauer wird beurteilt, ob eine adäquate Kontrolle der Krankheitsaktivität erreicht werden konnte. Ist dies nicht der Fall, wird in der Regel versucht, die Therapie durch Änderung des DMARDs oder Hinzufügen eines anderen DMARDs zu optimieren. Gerade in den letzten Jahren hat sich das Spektrum der einsetzbaren Arzneimittel durch die Einführung von selektiven COX-2 Hemmern und der sogenannten Biologika bedeutend erweitert. Unter Biologika versteht man hierbei rekombinante Wirkstoffe, die basierend auf den immunpathologischen Erkenntnissen zur Krankheitsentwicklung der RA, den Entzündungsprozeß spezifisch beeinflussen. Nach ihrem Angriffspunkt können sie in folgende Kategorien eingeteilt werden:

1. TNF α -Antagonisten – Infliximab (Remicade[®]), Etanercept (Enbrel[®]) und Adalimumab (Humira[®])
2. IL-1-Antagonisten – Anakinra (Kineret[®])
3. Wirkstoffe zur Elimination aktivierter B-Zellen – Rituximab (MabThera[®])

Die Etablierung dieser sehr potenten, aber auch kostspieligen Wirkstoffe in der Therapie der RA ist noch im Gange, so daß ihr Einsatz derzeit nur im Falle eines ungenügenden Ansprechens auf Methotrexat empfohlen wird (American College of Rheumatology 2002). Zu erwähnen ist, daß alle Vertreter dieser Klasse eine parenterale Applikation meist mehrmals wöchentlich erfordern. Als immunsuppressiv wirkende Substanzen besitzen sie typische Nebenwirkungen, wie das Auftreten opportunistischer Infektionen, die Reaktivierung einer latenten Tuberkulose und allergische Reaktionen am Ort der Applikation. Eine gelenkgerichtete Darreichungsform könnte die verabreichte Dosis und damit sowohl Kosten einer derartigen Therapie als auch das Risiko systemischer Nebenwirkungen reduzieren.

Vor diesem Hintergrund erscheinen gentherapeutische Ansätze zur Behandlung der RA sehr vielversprechend. Der Gentransfer kann hierbei mittels unterschiedlicher Methoden erfolgen: Nicht-viral beispielsweise mittels Liposomen, Partikelbeschuß oder DNA-Ligandenkomplexen, oder aber durch den meist effizienteren, viralen Gentransfer mittels

adenoviraler, retroviraler oder herpesviraler Vektoren. Auch in der Wahl der Applikationsart kann man zwischen systemischer und lokaler Verabreichung direkt ins betroffene Gelenk unterscheiden. Ebenso muß zwischen einer kontrollierten Infektion der Zellen außerhalb des Körpers (*ex vivo*), oder der direkten Gabe eines infektiösen Vektors (*in vivo*) differenziert werden. Die wachsenden Erkenntnisse über den immunpathologischen Mechanismus der RA führten zur Identifizierung verschiedener antirheumatischer Gene, z.B. IL-1RA, IL-4, IL-10, sTNFR, und damit auch zu zahlreichen Möglichkeiten bei der Wahl des therapeutisch wirksamen Transgens. Die anti-inflammatorisch wirkenden Zytokine IL-1RA und IL-10 erwiesen sich bereits in unterschiedlichen Tiermodellen als besonders geeignet (Müller-Ladner *et al.*, 1997; Müller-Ladner *et al.*, 1999; Whalen *et al.*, 1999). Ihre Kombination im SCID-Mausmodell der RA inhibierte sowohl die Invasion der synovialen Fibroblasten in den Knorpel als auch die Knorpeldegradation (Neumann *et al.*, 2002). Vor dem Hintergrund eines chronischen schubweisen Verlaufes der RA ist bei dieser Art der Therapie eine langandauernde und optimalerweise regulierbare Genexpression von Vorteil. Neben den Sicherheitsaspekten, die speziell mit der Applikation viraler Vektoren verbunden sind, stellt dies eine große Herausforderung in der Entwicklung geeigneter Vektoren dar (Evans *et al.*, 1999).

II. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung neuartiger *Herpesvirus saimiri* Vektoren für die somatische Gentherapie der rheumatoiden Arthritis, die eine induzierbare Expression von anti-inflammatorischen Interleukinen ermöglichen. Um dies zu erreichen, sollte ein eukaryotes Expressionssystem (GeneSwitch™) zusammen mit anti-inflammatorisch wirkenden Interleukinen in das virale Genom integriert und mittels der Methode der homologen Rekombination virale Vektoren aus fünf überlappenden Cosmiden hergestellt werden. Dabei sollten die Gene der bei der rheumatoiden Arthritis bereits als rekombinante Proteine eingesetzten Interleukine, IL-1RA, IL-10 und IL-13, verwendet werden. Nach Erhalt der modifizierten Vektoren sollten diese verifiziert, hochtitrige Stocks hergestellt und die Eigenschaften des induzierbaren Systems im Vektorkontext in Bezug auf Sensitivität und Selektivität charakterisiert werden. Im Anschluß sollte das Expressionsverhalten der Vektoren in OMK Zellen untersucht werden. Um den Einsatz der Vektoren in ersten präklinischen Studien im SCID-Mausmodell der rheumatoiden Arthritis vorzubereiten, sollten die beschriebenen Untersuchungen danach in humanen Fibroblasten durchgeführt werden.

III. Material und Methoden

1. Material

1.1. Chemikalien

Stoffbezeichnung

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
 Agarose
 Agarose für Pulsfeldgelelektrophorese
 Alkalische Phosphatase (CIP)
 Ammoniumacetat (NH₄OAc)
 Ammoniumpersulfat (APS)
 Aprotinin
 5'-Azacytidin (5'-AzaC)
 BCA™-Protein Assay Reagent
 Bisbenzimidazole, Hoechst-33258
 β-Mercaptoethanol (β-ME)
 Bromphenolblau (BPB)
 Chloroform
 Coomassie-Blau (Serva-Blau G250)
 Deoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs)
 Dimethylsulfoxid (DMSO)
 Dithiothreitol (DTT)
 Ethanol (EtOH)
 Ethidiumbromid (EtBr)
 Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA)
 Fötale Kälberserum (FKS)
 Formaldehyd
 Gelatine
 Gentamycin
 Glutamin
 Glycerol
 Glycin
 Hydrochinon
 Interleukin 1β, human, rekombinant
 Isoamylalkohol
 Isopropylthiogalactosid (IPTG)
 Leupeptin

Bezugsquelle

BioRad, München
 Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
 BioRad, München
 Roche Diagnostik, Mannheim
 Merck, Darmstadt
 Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen
 Pierce, BA Oud Beijerland, Niederlande
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen
 Serva, Heidelberg
 Merck, Darmstadt
 Serva, Heidelberg
 Roche Diagnostik, Mannheim
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen
 Roche Diagnostik, Mannheim
 Merck, Darmstadt
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen
 Merck, Darmstadt
 Biochrom KG, Berlin
 Merck, Darmstadt
 Riedel de Haen, Seelze
 Serva, Heidelberg
 Gibco/BRL, Eggenstein
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen
 Serva, Heidelberg
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen
 R&D Systems, Wiesbaden
 Merck, Darmstadt
 Biomol, Hamburg
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Lipofectamine [®] , Lipofectamine2000 [®]	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Luminol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Maltose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mifepriston (RU486)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mowiol 4-88 Mounting Medium	Calbiochem, Schwalbach
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumbisulfit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natrium-N-Lauroylsarkosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka, Ulm
Nonidet P40	Calbiochem, Schwalbach
OPTI-MEM7-Medium	Gibco/BRL, Eggenstein
p-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Phenol	Biomol, Hamburg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Progesteron	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ROX (6-Carboxy-X-rhodamin)	Molecular Probes, Oregon, USA
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Schwefelsäure konz. (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
SeaKem GTG Agarose	FMC Bio Products, Rockland, USA
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roche Diagnostik, Mannheim
Tween20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Galaktosid (X-Gal)	Biomol, Hamburg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

1.2. Puffer und Lösungen

FACS-Puffer	:	5% FKS, 0,02% Na-Azid in PBS _o .
K-Puffer	:	50mM KCl, 15mM Tris, 2,5mM MgCl ₂ , 0,5% Tween 20, 10µg/ml Proteinase K frisch zugegeben
Proben-Auftragspuffer für Agarosegele	:	30% Glycerol, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol
1xTE	:	10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8,0
4x Tris-HCl/SDS Puffer pH 6,8	:	30,25g Tris, ad 500ml H ₂ O, 2g SDS
Tris-gepufferte Salzlösung (TBE) 10x	:	890mM Tris/HCl, pH 8,0, 890mM Borsäure, 0,5mM EDTA
TE10/10	:	10mM Tris/HCl, 10mM EDTA, pH 8,0
SDS-Probenpuffer (2x)	:	62,5mM Tris/HCl, pH 6,8, 1mM EDTA, 10% Glycerol, 2% SDS, 5% β-ME, 0,0005% Bromphenolblau
SDS-Probenpuffer (6x)	:	35ml 4x Tris-HCl/SDS pH 6,8, 15ml Glycerol, 5g SDS, 4,65g DTT, 6mg Bromphenolblau, H ₂ O ad 50ml
SM-Puffer	:	5,8g NaCl, 2g MgSO ₄ , 50ml 1M Tris/HCl, pH 7,5, 0,01% Gelatine
SSC-Puffer (20x)	:	88g Natriumcitrat, 195g NaCl, H ₂ O ad 1000ml
RIPA-Puffer (2x)	:	50mM Tris/Cl, pH 7,5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1% Nonidet P40, 0,5% Na-deoxycholat, 0,1% SDS, 1µg/ml Leupeptin, 5µg/ml Aprotinin (frisch zugegeben)

Alle anderen Puffer und Lösungen werden unter der jeweiligen Methode aufgeführt.

1.3. Größenmarker für Gelelektrophorese

<i>Benchmark Prestained Protein Ladder</i>	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Biotinylierter Proteinmarker	Cell-Signaling, Beverly, USA
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
<i>MidRange Marker</i>	NEB GmbH, Frankfurt/Main

1.4. Biologisches Material

Eukaryote Zellen und Zelllinien

293T-Switch	:	Humane embryonale Nieren-Zelllinie, die durch Adenovirus Typ 5 (Ad5) transformiert wurde. Neben der Ad5 E1 Region enthalten 293T-Switch zusätzlich stabil integriert das SV40 (<i>Simian Virus 40</i>) T-Antigen, ein Gen für die Neomycinphosphotransferase (DuBridge <i>et al.</i> , 1987; Pear <i>et al.</i> , 1993). Hergestellt von C. Grillhösl durch Einbringen einer GeneSwitch™-Protein Bleocin-Kassette in 293T-Zellen.
HFF	:	Primäre menschliche Vorhautfibroblasten (human foreskin fibroblasts), etabliert aus Vorhautgewebe von ein bis sieben Tage alten Neugeborenen
OMK	:	Epitheliale Nieren-Zelllinie aus Nachtaffen (<i>Aotus trivirgatus</i>) etabliert (Owl monkey kidney, ATCC-CRL-1556) (Daniel <i>et al.</i> , 1976)
RASF	:	Isolierte Fibroblasten aus humanem Synovialgewebe von RA Patienten (wurden freundlicherweise von Herrn Prof. S. Gay, Institut für Rheumatologie, Zürich, zur Verfügung gestellt)

Medien für die Zellkultur

HFF/RASF	:	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit Zusatz von 10% FKS, 100µg/ml Gentamycin, 350µg/ml Glutamin und 10µg/ml Ciprofloxacin
OMK/293T-Switch	:	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit Zusatz von 10% FKS, 100µg/ml Gentamycin und 350µg/ml Glutamin

Die Medien wurden in Pulverform von der Firma Invitrogen/Gibco bezogen und mit sterilem H₂O (AMPUWA, Fresenius, Bad Homburg) angesetzt.

Weitere Lösungen für die Zellkultur

Trypsin	:	0,25%-ige Lösung in 140mM NaCl, 5mM KCl, 0,56mM Na ₂ HPO ₄ , 5mM D-(+)-Glukose, 25mM Tris/HCl
Trypsin/EDTA	:	0,25%-ige Lösung in 140mM NaCl, 5mM KCl, 0,56mM Na ₂ HPO ₄ , 5mM D-(+)-Glukose, 25mM Tris/HCl, 0,01% EDTA pH 7,0
PBS ₀	:	Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺ ; 138mM NaCl, 2,68mM KCl, 6,5mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5mM KH ₂ PO ₄

Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH10B	:	<i>F mcrA C(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZCM15 ClacX74 recA1 endA1 araD139C(ara, leu)7697 galU galK I⁻ rpsL nupG</i> (Invitrogen/GIBCO, Karlsruhe)
<i>E. coli</i> JM109	:	<i>e14⁻(McrA⁻) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) supE44 relA1C(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^fZCM15]</i> , (Stratagene, La Jolla, USA)
<i>E. coli</i> XL1Blue	:	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^fZCM15 Tn10 (Tet^r)]</i> (Stratagene, La Jolla, USA)

Medien für die Bakterienkultur

LB-Agar	:	15g Bacto-Agar in 1l LB-Medium, gegebenenfalls Zusatz von 50 bzw. 100µg/ml Ampicillin
LB-Medium	:	Luris-Bertani-Medium; 10g Casein, 5g Bacto-Hefe-Extrakt, 5g NaCl in 1l H ₂ O, pH 7,2
SOC-Medium	:	20g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Hefe-Extrakt, 2,5mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 20mM Glukose in 1l H ₂ O, pH 7,0

Virusstämme und bereits vorhandene Vektoren

HVS wt C488	:	<i>Herpesvirus saimiri</i> Stamm C488; Wildtyp-Isolat aus Totenkopffäffchen (<i>Saimiri sciureus</i>) (Desrosiers und Falk 1982)
Konstitutiver Vektor	:	durch homologe Rekombination hergestellter Vektor, der die beiden Zytokine IL-1RA und IL-10 unter CMV-Promotor-Kontrolle konstitutiv exprimiert (siehe Abb. 3)
Kontrollvektor	:	durch homologe Rekombination hergestellter Vektor, bei dem im Vergleich zum Wildtypvirus nur die Onkogene <i>StpC</i> und <i>Tip</i> über <i>Bst</i> 1107I-Verdau in Cosmid 331 deletiert wurden und statt dessen eine CMV-kontrollierte lacZ-Expressionskassette inseriert wurde

1.5. Cosmide, Plasmide und Vektorsysteme

Cosmide

Modifizierte linksterminale Cosmide basierend auf cos331

- Cosmid cos331dBst1107IIacZ

Das Cosmid cos331 enthält im ursprünglichen Zustand die beiden Onkogene *StpC* (Saimiri transformations-assoziiertes Protein der Gruppe C) und *Tip* (Tyrosinkinase interagierendes Protein). Sie sind für die Transformation humaner T-Lymphozyten essentiell, aber für die Virusreplikation nicht von Bedeutung (Biesinger *et al.*, 1995; Duboise *et al.*, 1998). Die Deletion dieser Onkogene wurde bei der Herstellung von Cosmid cos331dBst1107IIacZ mittels *Bst*1107I-Verdau erreicht und statt dessen ein 0,4kb PCR-Fragment des Plasmidvektors pNEB193 inseriert. Dieses Fragment enthält sowohl einen Polylinker, als auch das α -Fragment der β -Galaktosidase, und ermöglicht so eine Integration weiterer Fremdgene bei gleichzeitiger Kontrolle des Klonierungsverfahrens mittels Blau-Weiß Selektion.

- Linksterminale Cosmide mit integrierten konstitutiven Interleukinkassetten

Zur Herstellung der Cosmide zur konstitutiven Interleukinexpression wurden die durch *Nru*I-*Nae*I-Verdau aus dem Plasmid pCDNA3NB-IL-X (X=IL-1RA, IL-10, IL-13) gewonnenen Interleukinkassetten in die *Pme*I-Schnittstelle des Cosmids cos331dBst1107IIacZ inseriert. Die so erhaltenen Cosmide und die daraus hergestellten Vektoren lagen bereits vor.

- Insertion der Kasette des Transaktivatorproteins - Herstellung des Cosmids cos331dBst1107IIacZSwitch

Cosmid cos331dBst1107IIacZSwitch enthält die nach *Bsr*BI-Verdau aus dem Plasmid pSwitch gewonnene Kasette des Transaktivatorproteins des induzierbaren Expressionssystems. Die Integration erfolgte in die natürlich im Cosmid vorhandene *Swa*I Schnittstelle. Somit konnte ohne Beeinflussung eines Leserahmens ein linksterminales Cosmid cos331dBst1107IIacZSwitch konstruiert werden.

Modifizierte linksterminale Cosmide basierend auf cosDc5

- Cosmid Dc5d7172 und Cosmid cosDc5d71727475lacZ

Die Herstellung des Cosmids cosDc5d71727475lacZ erfolgte basierend auf Cosmid cosDc5d7172, bei dem die beiden Gene *orf71* (Eas associated death domain-like interleukin-1 converting enzyme like protease, genannt FLIP, ein virales Protein zur Apoptoseinhibition) und *orf72* (virales Homolog zu human D-Typ Cyclinen, genannt Cyclin, das den Übergang des Zellzyklus in die S-Phase beschleunigt und dadurch die Virusreplikation unterstützt, aber nicht essentiell ist) deletiert sind. Analog zu Cosmid 331dBst1107IIacZ wurde mittels *Bst*1107I-Verdau und Insertion des 0,4kb PCR

Fragments eine Integration weiterer Fremdgene bei gleichzeitiger Kontrolle der Klonierung mittels Blau-Weiß Selektion ermöglicht. Aus diesem Klonierungsschritt resultierte somit das Cosmid cosDc5d71727475lacZ, bei dem zusätzlich zu den Leserahmen *orf71* und *orf72*, eine partielle bzw. totale Deletion der Leserahmen *orf74* (virales Homolog des G-Protein gekoppelten IL-8 Rezeptors IL-8R, siehe oben) und *orf75* (virales Homolog der Formylglycinamidribotid-Amidotransferase, FGARAT, E.C. 6.3.5.3, ein die Virusreplikation unterstützendes Gen, welches aber im viralen Genom als *orf03* nochmals vorkommt, und deshalb an dieser Stelle entfernt werden kann) erfolgte.

- Rechtsterminale Cosmide mit integrierten konstitutiven Interleukinkassetten

Im Falle des konstitutiven Expressionssystems wurde die Insertion der CMV-kontrollierten Interleukinkassetten in die *PmeI* Schnittstelle des Cosmids cosDc5dBst1107IIacZ durchgeführt. Cosmid cosDc5dBst1107IIacZ wurde dabei aus Cosmid Dc5 durch *Bst1107I*-Verdau und anschließender Insertion des pNEB153-Polylinkers in Analogie zu cos331 hergestellt. Die so erhaltenen Cosmide, sowie die daraus resultierenden Vektoren, standen bereits zur Verfügung.

- Insertion der Kassette des Transaktivatorproteins - Herstellung des Cosmids cosDc5d717275Switch

Um eine Integration der Kassette des Transaktivatorproteins des induzierbaren Expressionssystems auch in das rechtsterminale Cosmid cosDc5d7172 zu erreichen, wurde diese in die im viralen Genom ursprünglich vorkommende *PmlI*-Schnittstelle inseriert. Dadurch wurde der Leserahmen *orf75* (siehe oben) zerstört, und es resultierte das Cosmid cosDc5d717275Switch.

Plasmide und Vektorsysteme

GeneSwitch™	:	Plasmidvektor System bestehend aus den Plasmiden pSwitch und pGene zur Mifepriston-induzierten Überexpression in eukaryoten Zellen (Invitrogen, Karlsruhe)
pBS-PGK	:	Derivat des pBluescript KS Vektors (Stratagene, La Jolla, USA) mit inseriertem PGK Promotor
pCDNA3NB-ILx	:	modifiziertes Plasmid pCDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe) ohne <i>NotI</i> -Schnittstelle in das, in eine Polylinker-Sequenz zwischen einem CMV/IE-Promotor/Enhancer und einer Polyadenylierungssequenz, die verschiedenen Interleukinkassetten für IL-1RA, IL-10 und IL-13 inseriert sind
pGL-Prom14	:	Derivat des pGL3basic Plasmidvektors (Promega, Mannheim) mit inseriertem Promotor des <i>orf14</i> Gens von <i>H. saimiri</i>

pNEB193	:	Derivat des pUC19 Plasmidvektors mit lacZ Leserahmen (NEB GmbH, Frankfurt)
pSTBlue-Acceptor	:	Vektor zur Klonierung mit Blau-Weiß-Selektion (Novagen, Madison, USA)
pTracerEF-lacZ	:	Expressionsvektor zur Überexpression rekombinanter Proteine gesteuert vom humanen EF-1 α Promotor, Invitrogen, Karlsruhe
pWE15	:	Cosmid-Vektor mit einer Klonierungskapazität von 30-42kb (Wahl <i>et al.</i> , 1987) (Stratagene, La Jolla, USA)

1.6. Oligonukleotide, Real-time PCR und Southern Blot Sonden

Motiv/Gen	Verwendung	Name	Sequenz (5'-3')
Actin	RT-PCR	Ark143	CCAAGGCCAACC GCGAGAAGATGAC
		Ark144	AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC
CCR5	Real-time PCR	CCR5fp	GGTGTT CAGGAGAAGGACAATGTT
		CCR5rp	TGGTCATCTGCTACTCGGGAAT
		CCR5rev-330T	5'-VIC-AGCCCTGTGCCTCTTCTTCTCATT TCG-TAMRA-3'
Cosmid mit EF-1 α Promotor	Vektor- Verifizierung	ARVef1	AAGTGCAGTAGTCGCCGTGAAC
Cosmid mit orf14 Promotor	Vektor- Verifizierung	297531	CTTCAATTCTTATAGCAACTTGTGTGTC
Cosmide mit verschiedenen Promotoren	Vektor- Verifizierung	SwitchN	CAGACACTTGGCGCACTTCG
GeneSwitch	RT-PCR	Switchi1	TCAACCTGTTAATGAGCATTGAACC
		Switchi2	TTGGCTAACTTGAAGCTTGACAAAC
	Bisulfit- Sequenzierung	RUal	GTTTTTGTAATTGTAGTAAGGAGAAAATAT
		RUar	CTCAAATAAATACCCTAACCTAACTAAC
		RUil	AAGTATTTATTAGGGTTATTGTTTTATGAG
		RUir	AAACAATACTAACTATACATACCTTC
IL-1RA	Vektor- Verifizierung, RT- PCR	il1rac	CTCAAACTGGTGGTGGGGC
		il1ran	GGAAATCTGCAGAGGCCTCC
IL-10	Vektor- Verifizierung, RT- PCR	il10c	GTTTCGTATCTTCATTGTCATG
		il10n	ATGCACAGCTCAGCACTGCTCTG
IL-13	Vektor- Verifizierung	Ark127	AAGCTTCCCAGCCTATGCATCCG
		Ark128	TCAGTTGAACCGTCCCTCGCG
orf3 (dhfr)	Vektor- Verifizierung	Big18245	GCCTTGGCCACTGCTTATAAATG
		Big18246	GCTTCTTTAGGCTTCACTGAGCAAG

orf25 (mcp)	Real-time PCR	MCPfp	CCATTTGCCTGTGTTGAGAGTTAA
		MCPrp	CTCATTACCAGACCCATGTTATGAA
		MCPprev-393T	5'-6-FAM-CTCCGAGAGAGCCTATCTGA GATGCCC-TAMRA-3'
orf57	RT-PCR	57e1	GGTGAACAACCTGCCAAATGG
		57e2	CTCGGCCTTTCTCGCTTTAG
pStBlue-Acceptor Vektor	Bisulfit- Sequenzierung	SP6	ATTTAGGTGACACTATAG
		T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Überlappregion 1	Vektor- Verifizierung	179988	AACTTGCTCCATTTTCTTC
		Ar4r	AGGGGTTTGCCGTTAAGC
	Southern Blot	179990	ATGGGGAAGATGCTATAAAG
		Ar3Br	GCTCCTTGACAGTTATGCCC
Überlappregion 2	Vektor- Verifizierung	Ar24Br	ACGTGCGAAGTAAGGCTAGTGC
		Ar25Br	GCCTATCTGAGATGCCCATGG
	Southern Blot	hr2a	CGTCTGCACCTCCTTTAGAAACCC
		hr2b	CCATAATAGAGTGCTCAGCTTGCC
Überlappregion 3	Vektor- Verifizierung, Southern Blot	Ar43r	GCTTCTTAAGGCCCTGTG
		hr3b	ACCTTGGCTGGCAGTGGTTTACTAA
		hr3a	TGTACGCAACCGTCTTCTTCAGATG
		orf52f2	GTTGTTGTAGCCATCATGGC
		Ar52r	GTTTTATGTTTAGACGCAGC
		Ar59f	TCTGCGGCTTTAGGGTTGTG
	Southern Blot	Ar56Bf	TTATCACTCCTTGCCTGCAGG
		Ar56Br	TGACCTTTTCAGGGTTGGGTG
Überlappregion 4	Vektor- Verifizierung	Ark58	CTAAATCAAGATTCAAACAACCC
		Ar69r	TGCAACGTTTGGCACTTAAATG
	Southern Blot	Ar67r	TGTCCATGGCTTGATACACACG
		Ark16	GTTGACTTTTGCCAAGGAATAATC

1.7. Antikörper, Antikörper Kits und Nachweisreagenzien

1.7.1. Antikörper

Monoklonale Antikörper				
Spezifität	Klon	Verwendung / Verdünnung	Markierung	Firma
anti-human-IL-13	32116.11	ELISA 2-4µg/ml		R&D Systems, Wiesbaden
anti-human-IL-1RA	10309.211	ELISA 5-10µg/ml		R&D Systems, Wiesbaden
anti-human-IL-10	23738.111	ELISA 1-4µg/ml IF 1:100		R&D Systems, Wiesbaden
anti-human-CD54 (ICAM-1)	15.2	FACS 1:50	FITC	Calbiochem, Schwalbach

Polyklonale Antikörper				
Spezifität	Spezies	Verwendung / Verdünnung	Markierung	Firma
anti-human-CD90 (THY-1)	5E10	FACS 1:50	PE	Pharmingen, Heidelberg
Isotypkontrollen	X40	FACS 1:10	FITC, PE	BD Biosciences, Heidelberg
anti-human MMP-3	Ziege	Western Blot 1:1000		R&D Systems, Wiesbaden
anti-human-NFκB-p65	Kaninchen	Western Blot 1:500, IF 1:100		Santa Cruz, Santa Cruz, USA
anti-human-IL-13	Ziege	ELISA 250-500ng/ml	Biotin	R&D Systems, Wiesbaden
anti-human-IL-1RA	Ziege	ELISA 100ng/ml	Biotin	R&D Systems, Wiesbaden
anti-human-IL-10	Ziege	ELISA 125-500ng/ml	Biotin	R&D Systems, Wiesbaden
anti-Biotin	Ziege	Western Blot 1:1000	HRP	Cell Signaling, Beverly, USA
anti-Kaninchen-IgG	Schwein	Western Blot 1:2000	HRP	DAKO, Hamburg
anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Western Blot 1:2000	HRP	DAKO, Hamburg
anti-Ziege-IgG	Kaninchen	Western Blot 1:2000	HRP	DAKO, Hamburg
anti-Maus-IgG	Schaf	IF 1:100	Cy3	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-Kaninchen-IgG	Ziege	IF 1:100	Cy3	Jackson Immuno-research, West Grove, USA

1.7.2. Antikörper-Kits und Nachweisreagenzien

ELISA-Duosets:	IL-1RA	R&D Systems, Wiesbaden
	IL-10	R&D Systems, Wiesbaden
	IL-13	R&D Systems, Wiesbaden
Streptavidin-HRP konjugiert		Dianova, Hamburg
TMB <i>Microwell Peroxidase Substrate System</i>		KPL, Gaithersburg, USA

1.8. Enzyme

Alle verwendeten Restriktions- und modifizierenden Enzyme wurden bei NEB (Frankfurt/Main), Roche Diagnostik (Mannheim), Invitrogen/GIBCO (Karlsruhe), Perkin Elmer (New Jersey, USA) und Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen und mit den dazugehörigen mitgelieferten Puffern laut Herstellerprotokoll verwendet. Für die PCR bzw. RT-PCR wurde die DNA-Polymerase Ampli-*Taq* (Perkin Elmer), sowie DNase-freie RNaseH (Roche Diagnostik), RNase-freie DNaseI (Boehringer, Mannheim), RNaseOUT (Invitrogen/GIBCO) und ThermoScript™ RT-PCR System Kit (Invitrogen/GIBCO) verwendet.

1.9. Software

FCS Express 2	Software zur Auswertung von FACS-Analysen (DenovoSoftware, Ontario, Kanada)
GCG <i>Wisconsin Package</i> 10.2	Software-Paket zur Sequenzanalyse (GCG, Wisconsin, USA)
<i>Sequence Collector Package</i> v3.0	Datenbank für Sequenzanalysen (ABI, Weiterstadt)
<i>Sequence Detection System</i> v1.6.3	Auswertesoftware für <i>Real-Time</i> PCR (Applied Biosystems, Darmstadt)
SOFTmax	ELISA-Auswertesoftware (MWG Biotech, Ebersberg)
<i>Vector NTi Suite</i> v5.5	Sequenzanalyse- und Daten-Management-Software für molekularbiologische und genetische Forschung (Informax, North Nethesda, USA)

2. Methoden

2.1. Virus-und Zellkulturverfahren

2.1.1. Kultivierung von Zellen

Eukaryote Zellen wurden im Brutschrank (Steri-Cult 200, Labotect, Göttingen) bei 37°C unter 5% CO₂-Gehalt und 80% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Sowohl 293T-Switch, OMK, HFF als auch RASF Zellen wachsen als Adhäsionskultur und wurden einmal wöchentlich trypsinisiert und im Verhältnis 1:3 bzw. 1:2 passagiert (293T-Switch Zellen zweimal wöchentlich 1:3 bis 1:5). Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in FKS/10% DMSO suspendiert und bei –80°C gelagert.

2.1.2. Transfektion von Cosmiden in OMK und 293T-Switch Zellen

Das Einbringen von Cosmid-DNA in OMK bzw. 293T-Switch Zellen erfolgte mittels Lipofektion (Lipofectamine® bzw. Lipofectamine2000®, Invitrogen/Gibco, Karlsruhe) gemäß Herstellerangaben in serumfreiem OPTI-MEM® - Medium. Das Transfektionsmedium wurde nach 5h durch serumhaltiges Medium ersetzt. Eine eventuelle Induktion erfolgte nach weiteren 24h und vorherigem Mediumwechsel mit 2µl 1mM Mifepristonlösung. Überstandsproben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen.

2.1.3. Herstellung und Isolierung von *Herpesvirus saimiri* Vektoren

Das Genom von *Herpesvirus saimiri* stand in Form überlappender Cosmide zur Verfügung. Zur Herstellung der rekombinanten Viren wurden fünf, das virale Genom überspannende, Cosmide verwendet (Ensser *et al.*, 1999). Dabei wurden Modifikationen lediglich in den beiden links- bzw. rechtsterminalen Cosmiden cos331 und cosDc5 durchgeführt (siehe auch Abbildung 3). Für die Transfektion von OMK Zellen wurde der pWE15-Vektoranteil aller fünf Cosmide durch *NotI*-Verdau entfernt und je 3µg der Cosmid-DNA-Kombinationen mit 15µl Lipofectamine® in serumfreiem Medium OPTI-MEM® gemischt, für 30-45min bei Raumtemperatur inkubiert und dann zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden dazu am Tag zuvor in kleine Zellkulturflaschen (25cm²) passagiert, so daß sie zum Transfektionszeitpunkt eine Konfluenz von ca. 80% erreichten. Durch homologe Rekombination in den OMK Zellen entstanden so rekombinante Viren, die nach 5-10 Tagen einen cytopathischen Effekt (CPE) verursachten. Nach vollständiger Lyse der Zellen wurden die Virussuspensionen aus dem durch Zentrifugation (1500rpm, 10min) von Zellresten geklärten Zellkulturüberstand gewonnen.

2.1.4. Vermehrung und Virustiterbestimmung von *Herpesvirus saimiri* Vektoren

Zur Virusvermehrung wurden am Vortag passagierte OMK Zellen durch Zugabe infektiöser Zellkultur-Überstände (1:12 bis 1:35 v/v) infiziert. Je nach Virus-Titer und

Replikationsverhalten der Viren trat nach 5 bis 10 Tagen ein CPE auf. Nach vollständiger Lyse der Kultur wurde der Kulturüberstand durch Zentrifugation (1500rpm, 10min) von Zellrückständen befreit, und als Virusstock aliquotiert bei -80°C gelagert. Zur Virustiterbestimmung wurden OMK Zellen am Vortag in Mikrotiterplatten ausgesät, so daß sie zum Infektionszeitpunkt eine Konfluenz von ca. 80% erreichten. Der zu bestimmende Virusüberstand wurde in einer Verdünnungsreihe von 10^{-3} bis 10^{-8} angesetzt, und die Zellen in einer Reihe der Platte mit jeweils einer Virusverdünnung infiziert. Zwischen Tag 7 und Tag 14 nach Infektion (je nach Grad der Virusreplikation) wurde der Titer nach der Methode von Spearman und Kärber bestimmt (Spearman und Kärber 1974).

2.1.5. Infektions- und Induktionsversuche mit *Herpesvirus saimiri* Vektoren

Infektionsversuche wurden entsprechend den Ergebnissen der Virustitrationen, so durchgeführt, daß rechnerisch pro Zelle eine definierte Menge an infektiösen Partikeln eingesetzt wurde (Zahl der Zellkultur infizierenden Partikel, *tissue culture infectious particles* – TCIP oder Multiplizität der Infektion, *multiplicity of infection* – moi). Das komplette Zellkulturmedium wurde 24h nach Infektion gewechselt, und gegebenenfalls eine Induktion mit 2µl einer 1mM Mifepristonstocklösung durchgeführt. Eventuelle morphologische Veränderungen der infizierten Zellkulturen wurden in regelmäßigen Abständen mikroskopisch kontrolliert. Abweichungen von dieser Vorgehensweise werden unter den jeweiligen Ergebnissen explizit beschrieben.

2.2. Nukleinsäure-Methoden

2.2.1. Standardmethoden

Folgende Methoden wurden nach Standardprotokollen entsprechend den angegebenen Literaturstellen oder nach Herstellerangaben durchgeführt:

- Ethanol- und Isopropanol-Fällung von Nukleinsäuren, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion, Restriktionsenzymspaltungen, Klenow-Auffüllreaktion, Transformation von Bakterien, andere grundlegende Klonierungsschritte, photometrische Nukleinsäurekonzentrationsmessungen und Agarosegelelektrophorese (Ausubel *et al.*, 2003; Sambrook *et al.*, 1989)
- DNA-Ligation mittels des *Takara Ligation Kits Ver.2* (Cambrex Bioscience, Apen)
- DNA-Gelextraktion mit Hilfe des *NucleoSpin Extract Kits* (Macherey-Nagel, Düren)
- Kleine Plasmidpräparationen durch alkalische Lyse nach Birnboim (Birnboim und Doly 1979)
- Große Plasmid/Cosmidpräparationen durch alkalische Lyse und anschließender Anionen-Austauschchromatographie mittels *Nucleobond-PC Kit* (Macherey-Nagel, Düren)

- Isolation zellulärer Gesamt-DNA mit *NucleoSpin Tissue Kit* (Macherey-Nagel, Düren)
- Isolation zellulärer Gesamt-RNA mit *Nucleospin RNA II Kit* (Macherey-Nagel, Düren)
- Modifizierte Cosmid-DNA wurde mit dem *Phagemaker Kit* (Novagen, Madison, USA) in λ -Phagen verpackt.
- Die Sequenzierung von DNA wurde nach der fluoreszenzmarkierten Farb-Terminatoren-Methode mit dem PRISM® *Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* (ABI, Weiterstadt) an einem ABI PRISM 3100 DNA-Sequenzier-Gerät (ABI, Weiterstadt) durchgeführt.

2.2.2. Aufreinigung viraler DNA aus Zellkulturüberständen

Virale DNA wurde nach lytischer Virusreplikation aus 1-2ml Überstand einer OMK-Kultur gewonnen. Dazu wurden vorher die Zelltrümmer mittels 10-minütiger Zentrifugation bei 1500rpm entfernt, und die Viruspartikel anschließend pelletiert (20000rpm, 2h, 4°C). Durch Zugabe von 100 μ l K-Puffer + 10 μ g Proteinase K und folgender Inkubation für 45min bei 56°C wurden die Viruspartikel lysiert. Nach Hitzeinaktivierung der Proteinase (95°C, 10min) wurde die Virus-DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für Restriktionsenzymverdaus und Southern Blot Untersuchungen erfolgte die Lyse der Virions in 100 μ l Lysepuffer und einstündiger Inkubation bei 56°C. Danach wurde die virale DNA durch zweimalige Phenol-Chloroform-Behandlung extrahiert und mit Ethanol gefällt. Das luftgetrocknete DNA Pellet wurde schließlich in H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert. Alle Arbeitsschritte bis zur Lyse der Viruspartikel wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Lysepuffer: 1x TE pH 8,5, 2% Natrium-N-Lauroylsarkosin, 200 μ g/ml Proteinase K

2.2.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Ein PCR-Ansatz enthielt ca. 10ng (Plasmid-DNA) bis 500ng (genomische DNA) Matrizen-DNA, je 20pmol Oligonukleotide, 200 μ M dNTPs, 3U DNA-Polymerase und 5 μ l 10x-PCR-Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 μ l. Zu Beginn der Amplifikation wurde die Matrizen-DNA durch Erhitzen auf 96°C für 1min denaturiert. Es wurden 35 Amplifikationszyklen mit den Schritten Denaturierung (96°C, 15s), Oligonukleotid-Hybridisierung (x°C, 30s) und Elongation (72°C, xs) durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur und Elongationszeit richtete sich nach den jeweils verwendeten Oligonukleotiden und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Zur Amplifikation von größeren DNA Fragmenten wurde das *Expand Long Template* PCR System bzw. *Expand High Fidelity* PCR System (Roche Diagnostics, Penzberg) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Effizienz der PCR-Reaktion wurde durch eine anschließende gelelektrophoretische Auftrennung von 3-5 μ l der

Probe überprüft. Es wurde ein PTC-200-Gerät mit Deckelheizung der Firma MJ Research verwendet.

2.2.4. Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die cDNA Synthese wurde mittels des ThermoScript™ RT-PCR Systems (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Dabei wurden zunächst 0,8µg gesamtzelluläre RNA, 8µl cDNA Synthese Puffer, 40U RNaseOUT und 2µl DNaseI (20U) in einem Volumen von 29µl für 30min bei 37°C inkubiert und damit von einer eventuellen Verunreinigung durch genomische DNA befreit. Nach Abstoppen der Reaktion bei 70°C für 10min wurden die Ansätze halbiert und mit jeweils 0,5µl Hexamer-Primern und poly-dT-Primern, 1µl 0,1M DTT, 20U RNaseOUT, 2µl 10mM dNTPs und 1µl Reverser Transkriptase bzw. H₂O als Kontrollreaktion versetzt. Nach 10min Inkubation bei 25°C und 45min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch 5-minütiges Erhitzen auf 85°C gestoppt. Zur Steigerung der Ausbeute wurde der komplementäre RNA-Anteil des entstandenen cDNA-RNA Hybrids durch einen Verdau mit 1µl RNaseH (2U/µl, 20min, 37°C) aus der Lösung entfernt. Jeweils 2µl dieser einzelsträngigen cDNA wurden für die nachfolgenden DNA-PCR-Reaktionen, wie oben beschrieben, verwendet.

2.2.5. Quantitative *Real-Time* PCR

Die Bestimmung der Viruspersistenz erfolgte mittels quantitativer *Real-Time* PCR mit einem ABI Prism 7700 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Darmstadt). Die Kopienzahl der viralen Genomkopien pro Zelle wurde anhand der Kopien an zellulärem CCR5 und viralem MCP (*orf25*) ermittelt. Dabei wurden 250ng Matrizen-DNA (in einem Volumen von 5µl) eingesetzt. Zur Bestimmung der Referenz-CT-Werte wurde eine Verdünnungsreihe eines jeweiligen Standards (10^{10} - 10^1 Moleküle) in parallelen PCR-Reaktionen mitgeführt. Die 50µl PCR-Reaktionsansätze enthielten je 0,2µM 6-ROX, 0,01% (v/v) PCR-Puffer, 5mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 2,5U *Taq* Polymerase (Perkin Elmer, Darmstadt), 0,1µM der entsprechenden Sonde CCR5rec-330T oder MCPprev-393T und jeweils 0,3µM der entsprechenden Primer - CCR5fp und CCR5rp oder MCPfp und MCPrp. Einem einmaligen Denaturierungsschritt von 5min bei 95°C folgten 40 Amplifikations-Zyklen mit Denaturierung (95°C, 15s), Oligonukleotid-Hybridisierung (60°C, 30s) und Elongation (68°C, 30s). Die Kopienzahl der eingesetzten Proben wurde anschließend über den probenspezifischen CT-Wert mit der Auswertesoftware (*Sequence Detection System Software*, Version 1.6.3) berechnet und durch Vergleich mit der Standard-Verdünnungsreihe ermittelt. Dabei wurden Mittelwerte aus jeweils zwei unabhängigen Meßreihen mit je zwei Meßwerten gebildet. Die Anzahl der Vektorkopien pro Zelle errechnete sich aus dem Verhältnis der viralen MCP-Kopien durch die Hälfte der CCR5-Kopien.

2.2.6. Bisulfit-Sequenzierung

Die Methode der Bisulfit-Sequenzierung dient der Untersuchung durch Methylierung modifizierter DNA. Basis dieser Methode ist die Eigenschaft des Bisulfits, Cytosin-Reste in Uracil zu verwandeln, während 5-Methyl-Cytosin unverändert bleibt. Bei der anschließenden Amplifikation mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden alle Uracil-Moleküle als Thymin gelesen, während die 5m-Cytosine weiterhin als Cytosin erkannt werden. Die verwendeten Lösungen wurden unter Schutzgas mit entgastem Wasser angesetzt. Die einzelnen Versuchsschritte sind im Nachfolgenden dargestellt:

1. Gewinnung der DNA

Die Gewinnung der Gesamt-DNA für die Bisulfit-Sequenzierung erfolgte mittels *NucleoSpin Tissue Kit* (Macherey-Nagel, Düren). 5µg der so erhaltenen DNA wurden dann mit entgastem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 64µl ergänzt.

2. Denaturierung der DNA

Anschließend wurden 2µl 10M NaOH zugegeben, und die DNA durch Inkubation bei 37°C für 15min denaturiert. Die vollständige Trennung der DNA wurde durch 2-minütiges Aufkochen bei 95°C unterstützt, und die DNA danach im Eisbad abgekühlt.

3. Sulphonierung und hydrolytische Desaminierung der DNA

Als nächstes wurden 1,2ml frisch hergestellte Bisulfitlösung zugegeben, der Ansatz mit Mineralöl überschichtet und über Nacht bei 55°C unter Lichtausschluß inkubiert. Nach Entfernung des Mineralöls erfolgte die Isolation der DNA mittels des *NucleoSpin-Extract-Kits* gemäß Herstellerangaben (Macherey-Nagel, Düren).

4. Desulphonierung und Aufreinigung der DNA

Nach Elution mit 35µl wurde das Volumen auf 100µl aufgefüllt, und 3µl 10M NaOH zugegeben. Durch Inkubation bei 37°C für 10min erfolgte die Desulphonierung der DNA. Die Fällung der bisulfitbehandelten DNA wurde durch Zugabe von 200µl 3M NH₄OAc, 750µl EtOH und Inkubation bei -20°C über Nacht durchgeführt. Nach Zentrifugation (30min, 14000rpm, 4°C) wurde das DNA-Pellet mit 70% EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in 20µl H₂O aufgenommen.

5. Nested PCR

Mit 1µl der gereinigten, bisulfitbehandelten DNA wurde eine Nested-PCR wie folgt durchgeführt:

1. PCR: 2µl bisulfitbehandelte DNA, 5µl PCR-Puffer, 1µl Primer RUal, 1µl Primer RUar, 4µl dNTPs, 0,5µl *Taq* Polymerase, ad 50µl H₂O
Einem einmaligen Denaturierungsschritt von 1min bei 95°C folgten 35 Amplifikations-Zyklen mit Denaturierung (95°C, 10s), Oligonukleotid-Hybridisierung (50°C, 20s) und Elongation (70°C, 40s).

2. PCR: 3µl PCR Produkt der ersten PCR, 10µl PCR-Puffer, 2µl Primer RUil, 2µl Primer RUir, 8µl dNTPs, 0,5µl *Taq* Polymerase, ad 100µl H₂O
Einem einmaligen Denaturierungsschritt von 1min bei 95°C folgten 45 Amplifikations-Zyklen mit Denaturierung (95°C, 10s), Oligonukleotid-Hybridisierung (45°C, 20s) und Elongation (70°C, 40s).

Das erhaltene PCR-Produkt wurde über eine Gelelektrophorese auf einem 1%igen Agarosegel mit anschließender Extraktion mittels *NucleoSpin-Extract-Kit* (Macherey-Nagel, Düren) aufgereinigt. Die für die Nested PCR benutzten Primer wurden mit Hilfe des Programms MethPrimer (Li und Dahiya 2002) ausgewählt.

6. Klonierung

Jeweils 2µl des endgültigen PCR-Produkts wurden mittels Takara-Ligationskit in den T-Überhang pStBlue *Acceptor* Vektor (Novagen, Madison, USA) eingesetzt und XL-1 Blue hitzekompetente Bakterien mit dem Ligationsprodukt transformiert. Dabei konnten positive Klone mittels Blau-Weiß-Selektion identifiziert werden, da die Insertionsstelle die für das α-Peptid kodierende Region des Enzyms β-Galaktosidase enthält. Positive Klone wurden anschließend vermehrt, und eine Plasmidpräparation durchgeführt.

7. Sequenzanalyse

Abschließend erfolgten Sequenzanalysen in beiden Orientierungen mittels eines automatischen ABI3100 Kapillarsequenzers (ABI, Weiterstadt). Dabei wurden die Standardprimer SP6 und T7 verwendet, die links und rechts der Insertionsstelle im pStBlue *Acceptor* Vektors (Novagen, Madison, USA) liegen. Zuvor wurden fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente der zu untersuchenden DNA-Probe mit Hilfe von Farb-Terminations-Reagenzien (Applied Biosystems, Darmstadt) in PCR-Ansätzen hergestellt. Die Bearbeitung der Sequenzrohdaten und Sequenzvergleiche erfolgten mit den Computerprogrammen GCG *Wisconsin Package* 10.2 und der *Sequence Collector Package* Software.

Puffer:

Bisulfitlösung: 20ml Natriumbisulfitlösung (0,4g/ml)

1ml 110mM Hydrochinonlösung

600µl 10M NaOH-Lösung

2.2.7. Southern Blot

Zur Kontrolle der homologen Rekombination bei der Vektorherstellung wurde ein Southern Blot mit *Sst*I gespaltener viraler DNA verschiedener Vektoren durchgeführt. Dabei wurden die Spaltansätze mittels eines 0,8%-igen Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Depurinierung (0,25N HCl, 20min) und Denaturierung (0,5N NaOH/1,5M NaCl, 30min) der aufgetrennten DNA unter leichtem Schütteln. Nach 15 minütiger Equilibration in Transferpuffer erfolgte der Transfer über Nacht auf eine Biotin A Membran (Pall, Portsmouth, England). Die beladene Membran wurde luftgetrocknet, und die DNA mittels Backen für 30min bei 80°C und UV-Crosslinking (0,5J/cm²) fixiert. Dem Präinkubationsschritt (Prähybridisierungspuffer für 37°C, mindestens 4h) folgte die Hybridisierung mit durch PCR hergestellten, biotinylierten Sonden über Nacht bei 37°C. Vor Zugabe der Sonden wurden diese für 5min bei 95°C aufgekocht, 5min auf Eis abgeschreckt und kurz abzentrifugiert. Dem Hybridisierungsschritt folgte jeweils zweimaliges Waschen in 2xSSC/2xSSC/0,5xSSC mit 0,1% SDS. Die letzten beiden Waschschrte wurden bei 37°C durchgeführt. Die Herstellung der Sonden, sowie die Detektion, erfolgte mit dem NEBlot Photoprobe™ Kit (NEB GmbH, Frankfurt/Main) gemäß Herstellerangaben.

2.3. Proteinmethoden und immunologische Verfahren

2.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Western-Blot-Analysen zum Nachweis der Bindung von Antikörpern an rekombinant exprimierte Proteine aus Zellkulturüberständen oder infizierten Zellen wurden nach Burnette et al. (Burnette 1981) durchgeführt. Zellkulturüberstände und Zellen wurden dabei zu bestimmten Zeitpunkten nach Induktion geerntet. Überstände wurden lediglich mit SDS-Probenpuffer versetzt, Zellen wurden vor und nach dem Abtrypsinieren mit PBSO gewaschen, pelletiert (1500rpm, 10min) und entweder direkt mit 2xSDS-Puffer versetzt oder einer RIPA-Lyse unterzogen. Die RIPA-Lyse erfolgte dabei durch Zusatz von 50µl RIPA-Puffer, 20-minütiger Inkubation auf Eis und nachfolgender Zentrifugation (14000rpm, 5min). Nach Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration wurden die RIPA-Lysate bei -20°C gelagert. Für eine SDS-Gelelektrophorese wurde je Spur eine definierte, gleiche Menge an so behandelten Zellkulturüberständen bzw. Lysat eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach Lämmli (Lämmli 1970). Der Vernetzungsgrad der Gele betrug 10%. Die Proteinproben wurden vor Auftrennung mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 3min bei 95°C aufgekocht und bei 200V (~ 50mA) für 50min aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für einen Western Blot verwendet. Dafür wurden die aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer (Hoefer TE77, Amersham Biosciences) auf eine PVDF-Membran (Millipore, Bedford, USA) übertragen (0,8mA/cm², 1,25h). Zur Kontrolle des Proteintransfers diente der direkt sichtbare, vorgefärbte *BenchMark*-Proteingrößenstandard. Zum Blockieren freier

unspezifischer Bindestellen wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Blockierungslösung geschwenkt. Die Inkubation mit dem in Blockierungslösung verdünnten Primärantikörper, sowie dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper, erfolgte für jeweils 1h unter Schütteln bei Raumtemperatur. Zwischen den Antikörperinkubationen wurde die Membran fünfmal für 5min unter Schütteln gewaschen. Nachgewiesen wurden die spezifisch gebundenen Antikörper mit Hilfe von Chemolumineszenz (*enhanced chemoluminescence* System, ECL) und einer CCD-Kamera (Fuji LAS-1000 Chemolumineszenz Detektionssystem, Raytest, Staubenhart).

Puffer:

Laufpuffer: 25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS

Transferpuffer: 25mM Tris, 200mM Glycin, 20% Methanol

Waschpuffer: PBS/0,1% Tween20

Blockierungslösung: PBS/0,1% Tween20, 5% Magermilchpulver

ECL (Lösung A): 100ml 1M Tris/Cl, pH8,6, 250mg Luminol in 1l H₂O

ECL (Lösung B): 110mg p-Coumarinsäure in 100ml DMSO

2.3.2. Immunadsorptionstest (ELISA)

96-well-Polystyren-Mikrotiterplatten (Nunc, Naperville, USA) wurden mit je 100µl/well in PBS gelöstem monoklonalen Antikörpern über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 200µl/well Blockpuffer für 1h bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach erneutem dreimaligen Waschen erfolgte die Inkubation mit den Proteinproben und einer Verdünnungsreihe der entsprechenden rekombinanten Interleukinstandards in einem Volumen von 100µl/well für 2h bei Raumtemperatur. Die Proteinproben wurden dabei in einer Verdünnung zwischen 1:3 und 1:30 in Verdünnungspuffer eingesetzt. Für Überstände infizierter Zellen, sowie für die jeweiligen Standardverdünnungen, wurde Verdünnungspuffer mit 1% Triton X-100 zur Virusinaktivierung verwendet. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation von 100µl/well der biotinylierten polyklonalen Antikörper für 1,5h bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde mit 100µl/well peroxidase-konjugiertem Streptavidin (1µg/ml) in einer Verdünnung von 1:20000 (v/v) für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurde die Peroxidaseaktivität als Maß für die Menge an gebundenem Antikörper durch Zugabe von je 100µl/well des TMB-Peroxidase-Substrates nach Angaben des Herstellers bestimmt. Nach einer variablen Zeitspanne von 5-20min (je nach erreichter Farbintensität) wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 50µl/well 1M H₂SO₄ gestoppt und photometrisch bei 450nm mit einem ELISA-Reader (MWG Biotech, Ebersberg) quantifiziert. Die gewonnenen Daten wurden mit dem Programm SOFTmax (MWG Biotech, Ebersberg) ausgewertet.

Puffer:

Waschpuffer: 0,1% Tween20 in PBS

Blockpuffer: 2% FKS, 5% Saccharose in PBS

Verdünnungspuffer: 0,2% FKS, 0,1% Tween20 in PBS

Verdünnungspuffer mit Triton: 0,2% FKS, 0,1% Tween20, 1% Triton X-100 in PBS

Stopplösung: 1M HCl

2.3.3. Durchflußzytometrie (FACS)

Infizierte und nicht-infizierte RASF Zellen wurden nach Abziehen des Mediums einmal mit Trypsin gewaschen, mit 3ml frischer Trypsinlösung vom Boden der 25cm² Zellkulturflasche gelöst und bei 1200rpm für 5min pelletiert. Nach Waschen mit PBS und erneuter Zentrifugation, wurden die Zellen in 3ml eines 1:1 Gemisches aus PBS und 4% Formaldehyd für 15min bei Raumtemperatur fixiert und erneut bei 2000rpm 5min zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschritte mit PBS und nachfolgender Zentrifugation bei 2000rpm für 5min. Im Anschluß wurden 200.000 Zellen pro Versuchsansatz in eine 96-well-Polystyren-Spitzbodenplatte pipettiert und mit FACS-Puffer ad 200µl aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation der Zellen bei 1200rpm 5min bei 4°C erfolgten zwei weitere Waschschritte mit FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation. Nun wurden die Zellen in 50µl einer Verdünnung des spezifischen Antikörpers resuspendiert und für 60min unter Lichtausschluß auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 200µl FACS-Puffer gewaschen, in 100µl PBS aufgenommen, in FACS-Röhrchen (Nunc, Naperville, USA) mit 200 µl PBS überführt und resuspendiert. Danach erfolgte die Messung der Proben im FACS-Calibur Durchflußzytometer (BD Biosciences, Heidelberg). Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm FCS Express 2 (DenovoSoftware, Ontario, Kanada) ausgewertet.

2.3.4. Immunfluoreszenz

HFF Zellen wurden in Objektträgern mit Zellkultur-Aufsatz (*Chamber Slides*, NUNC, Naperville, USA) ausgesät, am folgenden Tag infiziert und nach 24h mit 2µl Mifepristonlösung induziert. Nach weiteren 24h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 15min bei RT mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS zum Entfernen von Paraformaldehyd-Resten wurden die Zellen mit PBS/0,1% Triton X-100 für exakt 3min permeabilisiert und die Reaktion durch zweimaliges Waschen mit PBS abgestoppt. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Proben für 1h bei Raumtemperatur mit PBS/2% FKS abgesättigt. Die zum Nachweis verwendeten spezifischen Primärantikörper wurden in der Blockierlösung verdünnt, und die Präparate mit der Antikörper-Lösung 1h bei RT inkubiert. Nach

zweimaligem Waschen mit PBS₀ erfolgte die Inkubation mit einem Cy3-fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörper. Nach Lufttrocknen der Objektträger wurden die Präparate mit 1µg/µl Hoechst-33258 gegengefärbt und mit *Mowiol Mounting Medium* eingedeckelt. Ausgewertet wurden die Immunfluoreszenzen an einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophat-2, Zeiss, Göttingen).

Puffer:

Permeabilisierungslösung: PBS/0,1% TritonX-100

Blockierlösung: PBS/2% FKS

2.3.5. Simultane Detektion membrangebundener Zytokine

Die Durchführung erfolgte, bis auf die Detektionsreaktion, gemäß Herstellerangaben für das *Human Cytokine Array V* (RayBiotech, Norcross, USA). Zur Detektion wurden jedoch die unter 2.3.1 aufgeführten ECL Lösungen, sowie die CCD-Kamera (Fuji LAS-1000 Chemolumineszenz Detektionssystem, Raytest, Staubenhardt) verwendet.

IV. Ergebnisse

1. Insertion regulierter therapeutischer Gene in Cosmide

1.1. Cosmide für die regulierte Genexpression mit attenuierten Vektoren

Die Grundlage zur Herstellung attenuierter, rekombinanter Viren bildete das Prinzip der homologen Rekombination aus fünf überlappenden Cosmiden (Cunningham und Davison 1993) (Abb. 3, Bildmitte). Dieses erlaubt die einfache Darstellung attenuierter Viren und deren Manipulation durch Modifikation einzelner Cosmide, bei gleichzeitigem Ausschluß einer Wildtypverunreinigung. Im hier verwendeten System aus fünf überlappenden Cosmiden (Ensser *et al.*, 1999) bilden in allen hergestellten Vektoren drei mittlere Cosmide (cos261, cos291 und cos336) ein zum Wildtypvirus unverändertes Grundgerüst. Modifikationen wurden lediglich in den links- und rechtsterminalen Cosmiden cos331 und cosDc5 eingeführt. In Vorarbeiten wurden für die Virusreplikation nicht notwendige, virale Gene entfernt bzw. zerstört und damit Raum für die Insertion von Fremdgenen geschaffen. Diese Modifikationen der beiden terminalen Cosmide sind unter „Material und Methoden“ näher erläutert. Nachfolgend sind die im Rahmen dieser Arbeit erfolgten weiteren Veränderungen beschrieben.

- Herstellung der Cosmide cos331dBst1107IIacZSwitch-IL-X (X=1RA, 10, 13)
Es wurde die *PmeI*-Schnittstelle des eingefügten lacZ-Polylinkers in Cosmid cos331dBst1107IIacZSwitch verwendet, um die induzierbaren *BsaAI*-*SspI* Interleukinkassetten aus Plasmid pGeneV5HisAdNot-IL-1RA/10/13 in das virale Genom zu integrieren. Die daraus resultierenden Cosmide werden im Nachfolgenden cos331dBst1107IIacZSwitch-IL-X (X=IL-1RA, IL-10, IL-13) genannt.
- Herstellung der Cosmide cosDc5d71727475lacZ-IL-X (X=1RA, 10, 13)
Auch hier wurde in Analogie zu cos331dBst1107IIacZ die *PmeI*-Schnittstelle des eingefügten Polylinkers im Cosmid cosDc5 d71727475lacZ verwendet, um induzierbare Interleukinkassetten auch rechtsterminal in das virale Genom zu integrieren. Die so erhaltenen Cosmide werden im weiteren Verlauf cosDc5d71727475lacZ-IL-X (X=1RA, 10, 13) genannt.

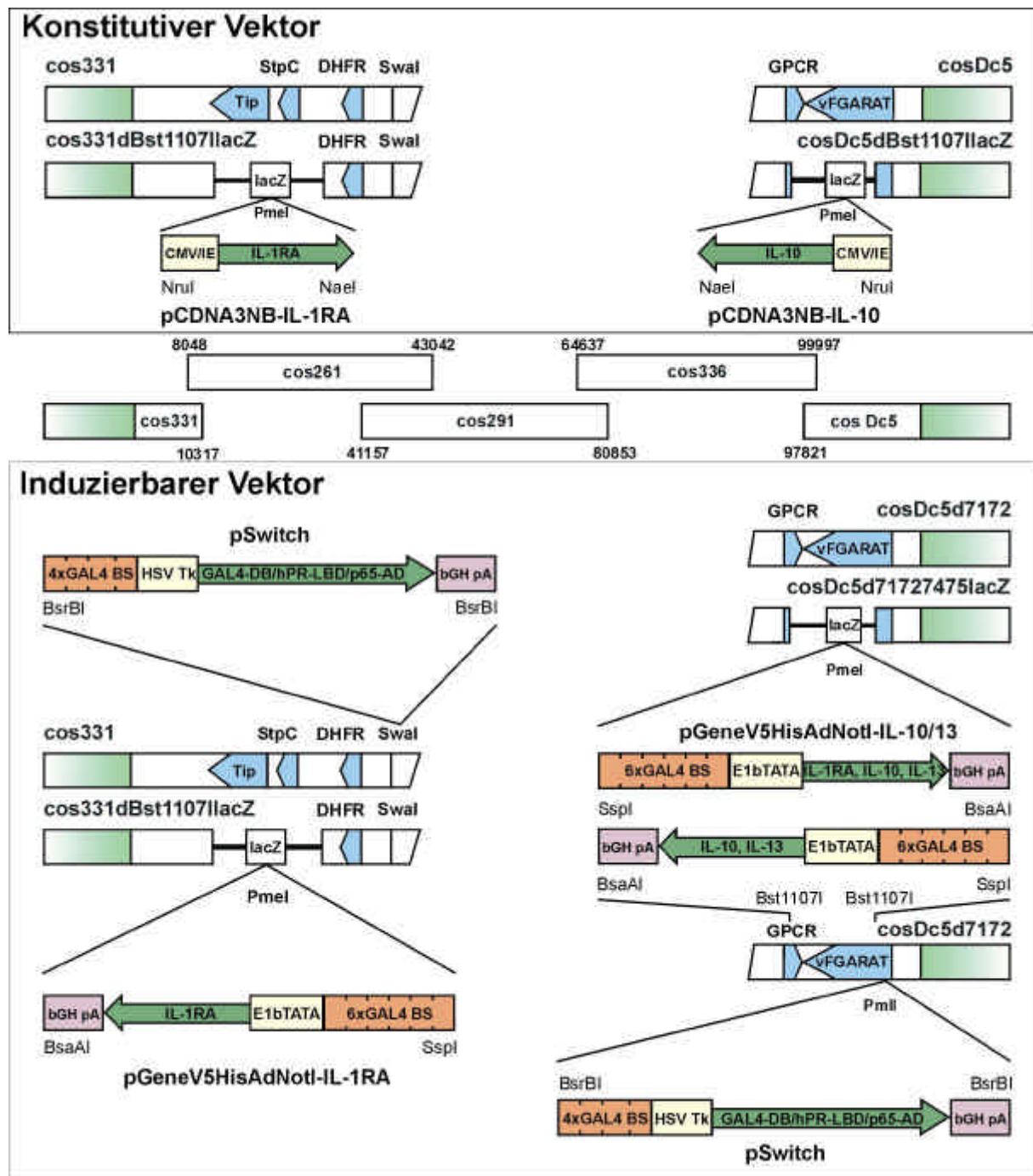


Abb. 3: Übersicht über die Konstruktion der Vektoren. In der Bildmitte sind die das virale Genom überspannenden fünf Wildtyp-Cosmide dargestellt. Modifikationen wurden nur an den links- bzw. rechtsterminalen Cosmiden cos331 und cosDc5 vorgenommen. Die Cosmide cos331dBst1107IIacZ und Dc5dBst1107IIacZ enthalten einen Polylinker sowie das α -Fragment der β -Galaktosidase (*lacZ* genannt) an Stelle eines *Bst1107I*-Fragments. In nachfolgenden Klonierungsschritten wird so eine Blau-Weiß-Selektion rekombinanter Cosmide ermöglicht. Die entfernten *Bst1107I*-Fragmente enthielten für die Virusreplikation nicht-essentielle Genomsequenzen. Die singuläre *PmeI* Schnittstelle des inserierten Polylinkers wurde anschließend für die jeweilige Integration der entsprechenden konstitutiven bzw. induzierbaren Interleukinkassette verwendet. Im Falle des induzierbaren Systems wurde in die, im Cosmid cos331dBst1107IIacZ vorhandene, *Swal*-Schnittstelle die Expressionskassette des Transaktivatorproteins (GeneSwitch™, aus Plasmid pSwitch) inseriert. Um eine Integration beider Bestandteile des induzierbaren Expressionssystems auch in das rechtsterminale Cosmid zu erreichen, wurde die entsprechende induzierbare Interleukinkassette direkt mit dem *Bst1107I*-*Bst1107I*-Fragment ausgetauscht und die Expressionskassette des Transaktivatorproteins in eine vorhandene *PmlI*-Schnittstelle in Cosmid Dc5 inseriert.

- Herstellung der Cosmide cosDc5d71727475Switch-IL-X (X=1RA, 10, 13)

Zur Insertion des zweiten Bestandteils des induzierbaren Expressionssystems in das rechtsterminale virale Genom wurde nach *Bst*1107I-Verdau des Cosmids cosDc5d7172Switch die entsprechende *Sspl*-*Bsa*AI-Interleukinkassette direkt integriert. Die daraus resultierenden Cosmide werden im Nachfolgenden cosDc5d71727475Switch-IL-X (X=1RA, 10, 13) genannt.

Um Rückligation zu vermeiden, wurden alle Cosmide nach Restriktionsenzymverdau mit Phosphatase behandelt. Die Ligationen mit den eingefügten DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung des Takara *Rapid Ligation Kits* unter Bedingungen, welche zu bevorzugter Bildung konkatemerer DNA führen. Die somit gewonnenen Ligationsprodukte wurden in λ -Phagen verpackt, in JM-109 Bakterien eingebracht und dort vermehrt.

1.2. Überprüfung der Cosmide des induzierbaren Expressionssystems

1.2.1. Restriktionsenzymverdau

Die erhaltenen Cosmide des induzierbaren Expressionssystems wurden per Restriktionsenzymverdau mit *EcoRI* und *EcoRV* überprüft und die erhaltenen Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 4). In beiden Ansätzen stimmte das erwartete mit dem tatsächlichen Bandenmuster überein.

Abb. 4a:

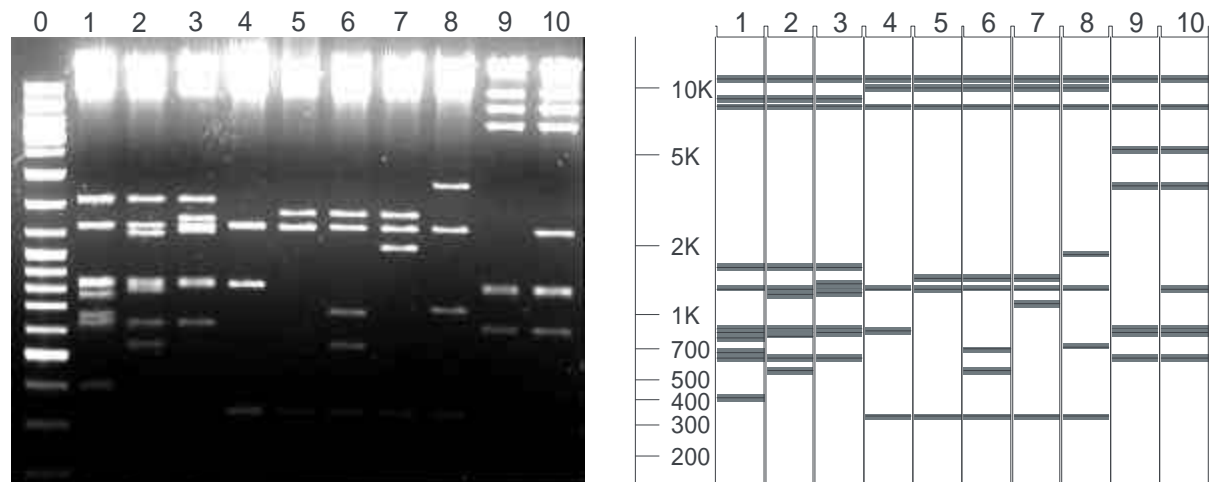


Abb. 4b:

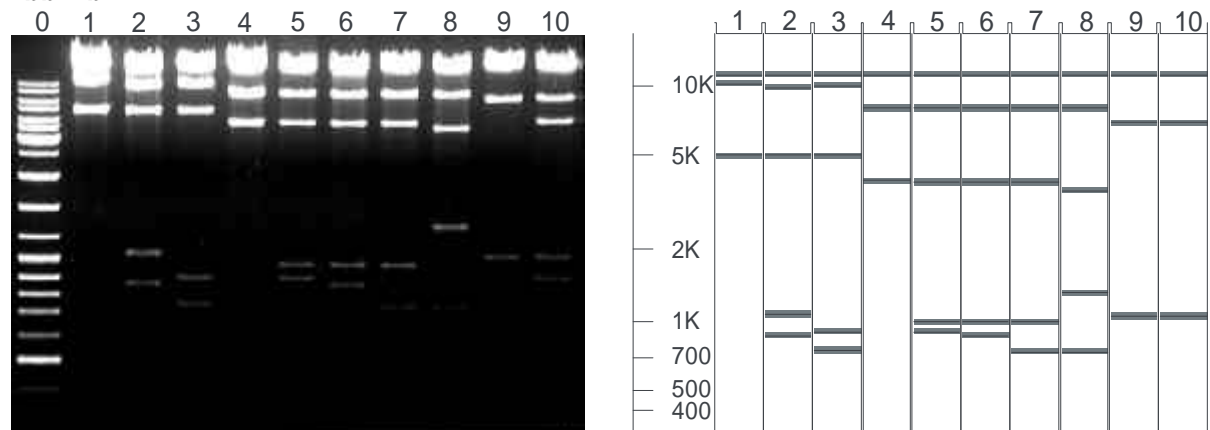


Abb. 4: Restriktionsenzymverdau mit *EcoRI* (4a) und *EcoRV* (4b) – Gelphoto nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 1%-igen Agarosegel. 0: Größenstandard (GeneRuler™), 1: cos Dc5d717275Switch, 2: cos Dc5d71727475Switch-IL-10rev, 3: cos Dc5d71727475Switch-IL-1RA, 4: cos Dc5d71727475lacZ, 5: Dc5d71727475lacZ-IL-1RA, 6: cos Dc5d71727475lacZ-IL-10, 7: cos Dc5d71727475lacZ-IL-13, 8: cos Dc5d71727475lacZ-IL-13rev, 9: cos 331dBst1107lacZSwitch, 10: cos 331dBst1107lacZSwitch-IL-1RArev. Rechts neben dem Gelphoto ist jeweils zum Vergleich das errechnete Bandenmuster der Spaltung abgebildet (mit *Vector NTi* simulierter Restriktionsverdau). Bei der Vektorbezeichnung bedeutet „rev“, daß die komplette Interleukinkassette in reverser Orientierung im entsprechenden Cosmid vorliegt (siehe Abb. 3).

1.2.2. Induzierbare Interleukinexpression

Zur Gewährleistung der Funktion wurde exemplarisch 1 µg der induzierbaren Cosmide cos331dBst1107IIacZSwitch-IL-1RArev und cosDc5d71727475lacZ-IL-1RA durch Lipofektion in OMK bzw. 293T-Switch Zellen eingebracht. Die 293T-Switch Zellen exprimieren stabil das GeneSwitch™-Transaktivatorprotein des induzierbaren Expressionssystems und wurden für Cosmide verwendet, die dieses nicht beinhalten. Die Genexpression wurde 24h nach Transfektion durch Mifepriston induziert, und an den beiden folgenden Tagen wurden jeweils Überstandsproben entnommen. Der Nachweis der Interleukinexpression im Überstand erfolgte per Sandwich-ELISA (Abb. 5).

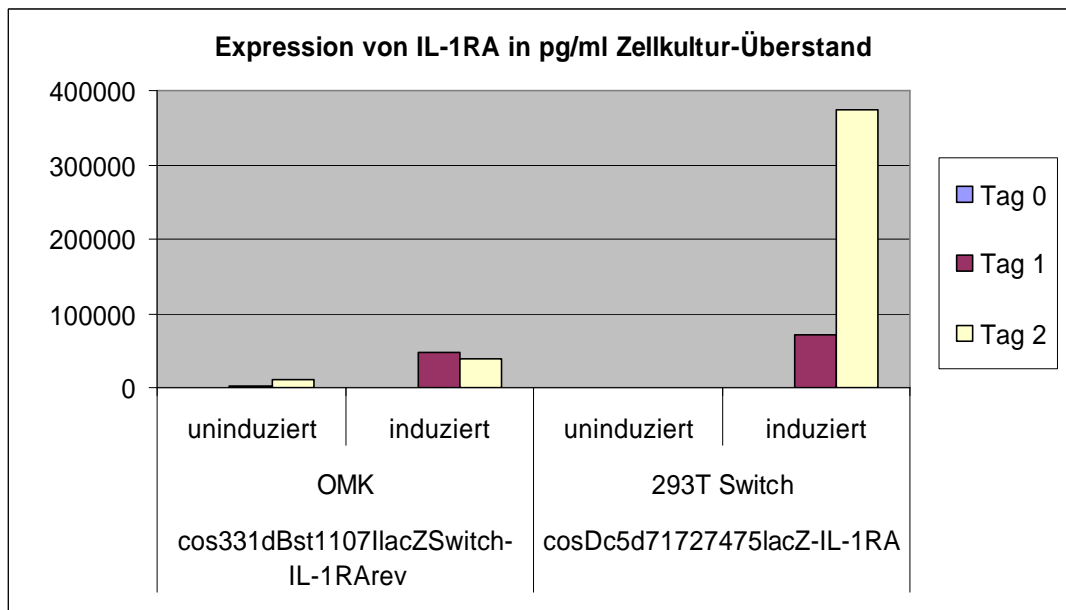


Abb. 5: Transiente Expression der Interleukine nach Cosmid-Lipofektion in OMK bzw. 293T-Switch Zellen. Im induzierten Zustand ist in beiden Zellsystemen eine deutlich höhere IL-1RA Expression im Vergleich zum uninduzierten Zustand zu beobachten.

Wie in Abb. 5 ersichtlich, war eine regulierbare Interleukinexpression in beiden getesteten Cosmiden möglich, so daß diese im induzierten Zustand eine deutlich höhere IL-1RA Expression als im uninduzierten Zustand zeigten. OMK Zellen wiesen, im Vergleich zu 293T-Switch Zellen, einen höheren Hintergrund im uninduzierten Zustand und eine geringere Expression auf.

2. Rekombinante *Herpesvirus saimiri* Vektoren

2.1. Darstellung der rekombinanten Vektoren

Die Cosmide des induzierbaren Expressionssystems wurden in verschiedenen Kombinationen zusammen mit den drei nicht modifizierten Grundgerüst-Cosmiden mittels Lipofectamine®-Transfektion in OMK Zellen eingebracht. Dabei wurde der pWE15-Vektoranteil der Cosmide vorher durch einen *NotI*-Verdau entfernt. Bei erfolgter homologer Rekombination der überlappenden fünf Cosmide konnten so rekombinante Vektoren hergestellt werden. Dies führte in der Zellkultur zum Auftreten eines für *Herpesvirus saimiri* typischen cytopathogenen Effekts nach 5-10 Tagen. Nach insgesamt 14-28 Tagen war die komplette Zellkultur lysiert. Zur weiteren Vermehrung der Vektoren wurden weitere Zellkulturen mit geringen Mengen der gewonnenen Virussuspensionen infiziert. Die so erhaltenen Virussuspensionen der ersten Passage wurden jeweils aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Die Herstellung nachfolgender Generationen wurde in analoger Weise durchgeführt. Alle erhaltenen Vektoren sind in Tabelle 1 aufgeführt. Sie zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten und erreichten Titer an infektiösen Viruspartikeln, vergleichbar dem Wildtypvirus-Isolat C488.

Nr.	linksterminales Cosmid	Grundgerüst-Cosmide			rechtsterminales Cosmid
1	331dBst1107IIacZSwitch	261	291	336	Dc5d71727475lacZ-IL-10
2	331dBst1107IIacZSwitch	261	291	336	Dc5d71727475lacZ-IL-13
3	331dBst1107IIacZSwitch	261	291	336	Dc5d71727475lacZ-IL-13rev
4	331dBst1107IIacZSwitch	261	291	336	Dc5d71727475lacZ-IL-1RA
5	331dBst1107IIacZSwitch-IL-1RArev	261	291	336	Dc5d71727475lacZ-IL-10
6	331dBst1107IIacZSwitch-IL-1RArev	261	291	336	Dc5d71727475lacZ-IL-13
7	331dBst1107IIacZSwitch-IL-1RArev	261	291	336	Dc5d71727475lacZ-IL-10rev
8	331dBst1107IIacZSwitch-IL-1RArev	261	291	336	Dc5d71727475lacZ-IL-13rev
9	331dBst1107IIacZSwitch-IL-1RArev	261	291	336	Dc5d717275Switch-IL-10rev
10	331dBst1107IIacZSwitch-IL-1RArev	261	291	336	Dc5d71727475lacZ-IL-1RA
11	331dBst1107I	261	291	336	Dc5d717275Switch-IL-1RA
12	331	261	291	336	Dc5d717275Switch-IL-10rev

Tabelle 1: Übersicht der hergestellten attenuierten, rekombinanten Vektoren. Die Nummerierung der Vektoren wird in analoger Weise weiterverwendet. In der Tabelle bedeutet „rev“, daß die komplette Interleukinkassette in reverser Orientierung im entsprechenden Cosmid vorliegt (siehe Abb. 3).

2.2. Überprüfung der rekombinanten Vektoren

2.2.1. Gesamtlänge der viralen L-DNA

Die Gesamtlänge des kodierenden L-DNA Fragments des viralen Genoms der rekombinanten Vektoren wurde mittels Pulsfeldgelelektrophorese überprüft. Nach *Sma*-Restriktionsenzymverdau zur Entfernung der H-DNA wurden die Fragmente aufgetrennt. Eine Degradation der viralen DNA durch Scherkräfte während der Präparation sollte durch Aufnehmen der Viruspellets in niedrigschmelzender Agarose vermieden werden. Im Anschluß erfolgte die Lyse der Virions und der Restriktionsenzymverdau der viralen DNA in den sogenannten Agarose-Plaques. Dieses Vorgehen lieferte erwartungsgemäß eine Bande von ca. 112kb, entsprechend dem vollständigen Fragment der L-DNA (Abb. 6). Unterschiede in der Bandenintensität der einzelnen Vektoren erklären sich durch präparativ bedingte Unterschiede der viralen DNA-Menge in den Plaques. Degradation des DNA-Fragments, Überladungsphänomene und kontaminierende zelluläre DNA führen zu dem hier auftretenden „Schmier“ ober- und unterhalb der 112kb Bande.

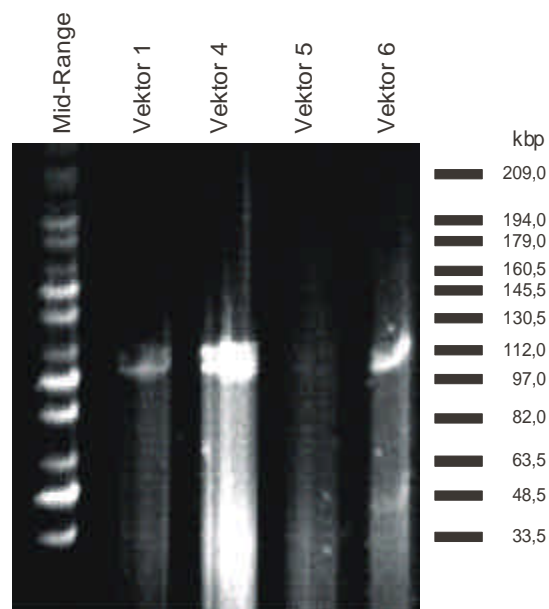


Abb. 6: Gesamtlänge des viralen L-DNA Fragments. Nach Spaltung der viralen DNA mittels *Sma*-Verdau wurde diese pulsfeldgelelektrophoretisch aufgetrennt. Spur 1: *Mid-Range Marker*, Spur 2-5: verschiedene Vektoren (siehe Tabelle 1). Vektor 1, 4 und 6 zeigen eine deutliche Bande bei 112kb. Bei Vektor 5 ist eine schwache Bande dieser Größe zu erkennen. Unterschiede in der Bandenstärke beruhen auf variierenden DNA-Mengen, die aufgrund der Präparationsmethode auftreten. In allen Proben ist DNA-Degradation erkennbar.

2.2.2. Homologe Rekombination

Die überlappenden Bereiche der fünf Cosmide des induzierbaren Vektors 5, des konstitutiven Vektors und des Kontrollvektors wurden zur Überprüfung der korrekten homologen Rekombination mittels PCR mit dem Wildtypvirus-Isolat verglichen (Abb. 7A). Dabei wurden die Amplifikate so gewählt, daß sie möglichst die komplette überlappende Region auf einmal überspannten (Regionen 1, 2 und 4). Nur für die über 16kb große Überlappregion 3 waren drei ineinander verschachtelte PCR Amplifikate notwendig. Die rekombinanten Vektoren weisen dasselbe Bandenmuster wie das Wildtypisolat auf. Ein deutlicher Hinweis, daß die homologe Rekombination ohne wesentliche Überlappingsfehler erfolgreich funktioniert hat (Abb. 7A).

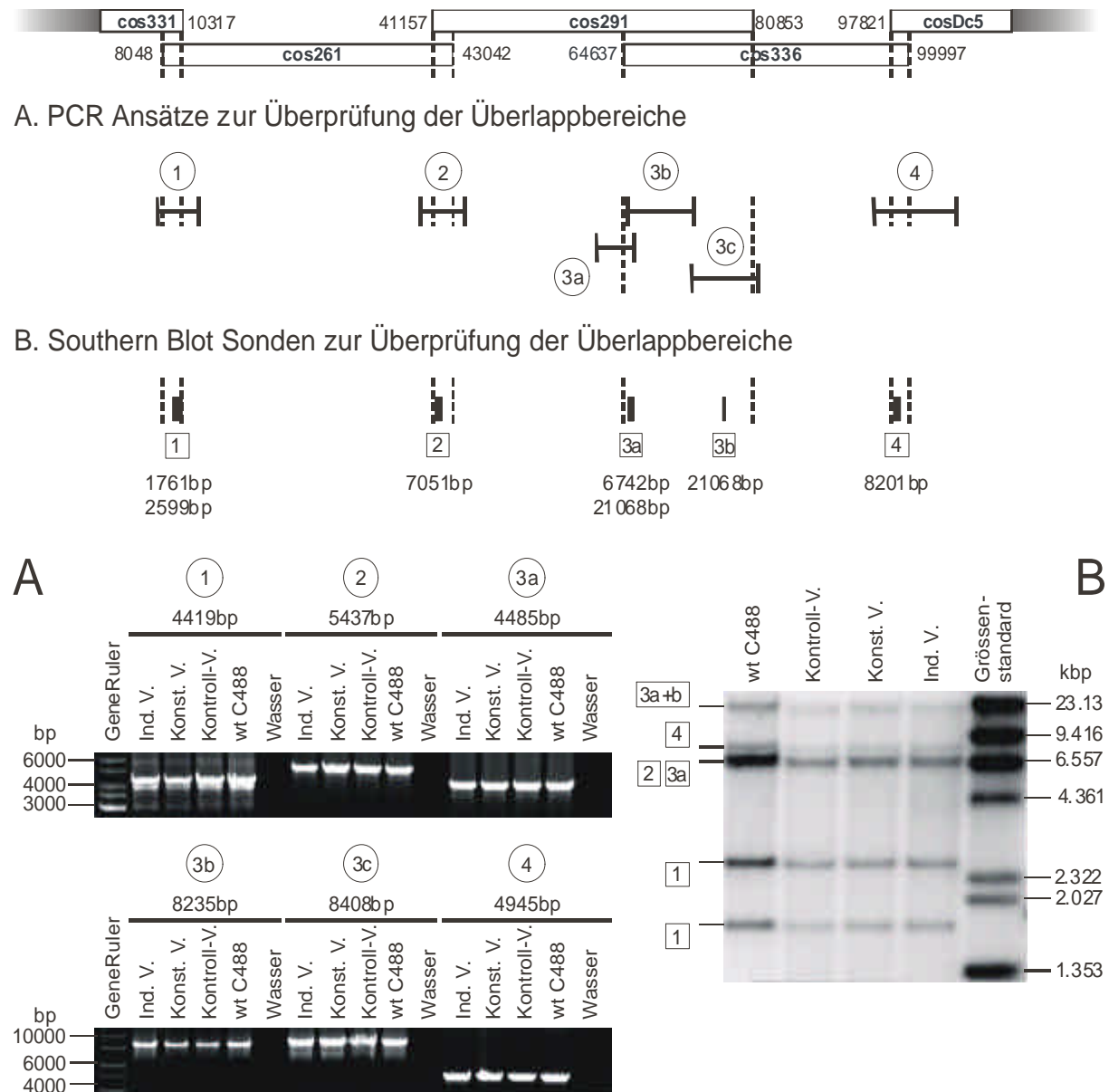


Abb. 7: Überprüfung der homologen Rekombination mittels PCR und Southern Blot Analyse. Oben dargestellt sind die fünf überlappenden Cosmide mit den jeweiligen Überlappungsregionen. Darunter sind die Lage der verschiedenen PCR Amplifikate (A) und die DNA-Sonden (B) mit ihren jeweiligen Detektionsbanden aufgeführt. Untersucht wurden hier jeweils der induzierbare Vektor 5 (siehe Tab. 1), der konstitutive Vektor und der Kontrollvektor. Als Positivkontrolle diente DNA des Wildtypvirus-Isolats C488. Abbildung 7A zeigt das Ergebnis der PCR Analyse. Die verschiedenen PCR Ansätze sind nummeriert und mit der zu erwartenden Bandengröße dargestellt. In allen rekombinanten Vektoren zeigt sich dasselbe Bandenmuster wie im Wildtypvirus. Abbildung 7B zeigt das Ergebnis der Southern Blot Untersuchung. Dabei sind links die Sonden den jeweiligen Banden zugeordnet. Auch hier zeigt sich ein zum Wildtypvirus vergleichbares Bandenmuster.

Zusätzlich zur PCR wurde eine Southern Blot Untersuchung der Überlappungsregionen durchgeführt (Abb. 7B). Dabei wurde die virale DNA der Vektoren mit dem Restriktionsenzym *SstI* geschnitten, die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Biodyne A Membran transferiert. Die Detektion der spezifischen Banden erfolgte mit biotinylierten Sonden, die innerhalb der Überlappungsregionen liegen. Für die dritte Überlappungsregion wurden zwei Sonden gewählt. Die Detektion und Auswertung erfolgte

mit Hilfe von Chemolumineszenz und einer gekühlten CCD-Kamera. Alle rekombinanten Vektoren zeigten auch hier ein analoges Bandenmuster wie das Wildtypvirus, was auf fehlerfreie homologe Rekombination schließen lässt.

2.2.3. Präsenz der Interleukinkassetten

Zur Überprüfung, ob die hergestellten Vektoren die inserierten Interleukinkassetten enthalten, wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf die jeweilig inserierten Zytokine durchgeführt. Abbildung 8 zeigt das Ergebnis der PCR in Bezug auf die eingebrachten Interleukinkassetten für alle Vektoren aus Tabelle 1. Wie daraus ersichtlich, enthalten alle Vektoren die entsprechenden Interleukinkassetten.

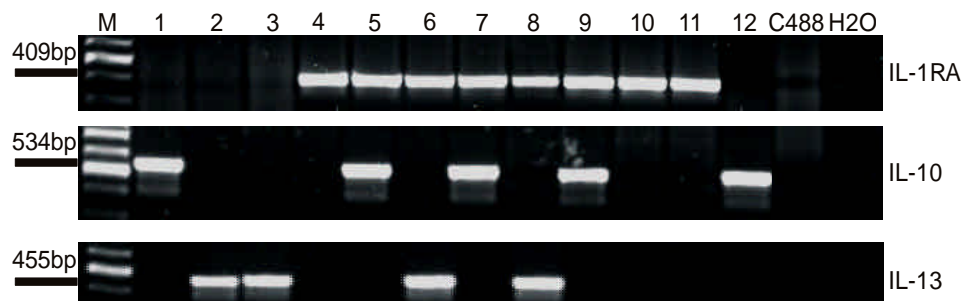


Abb. 8: PCR-Analyse der hergestellten induzierbaren Vektoren. Spur 0: Größenstandard (GeneRuler™), Spur 1-12 verschiedene Vektoren nach Tabelle 1, Spur 13: Wildtypvirus Isolat C488 als Negativkontrolle, Spur 14: Wasserkontrolle. Die hellere Bande des Größenstandards entspricht 500bp. Das jeweilige detektierte Interleukin ist rechts, die errechnete Bandengröße der PCR-Produkte links dargestellt.

2.2.4. Funktion der induzierbaren Vektoren in OMK Zellen

2.2.4.1. Interleukinexpression in OMK Zellen

Zum Nachweis der induzierbaren Expression der inserierten Interleukine wurden OMK Zellen mit gleichen Mengen virushaltigen Zellkulturüberstands infiziert, nach 24h induziert und nach weiteren 48h Überstandsproben entnommen. Die Überstände wurden per ELISA auf die Expression der jeweiligen Zytokine untersucht (Abb. 9).

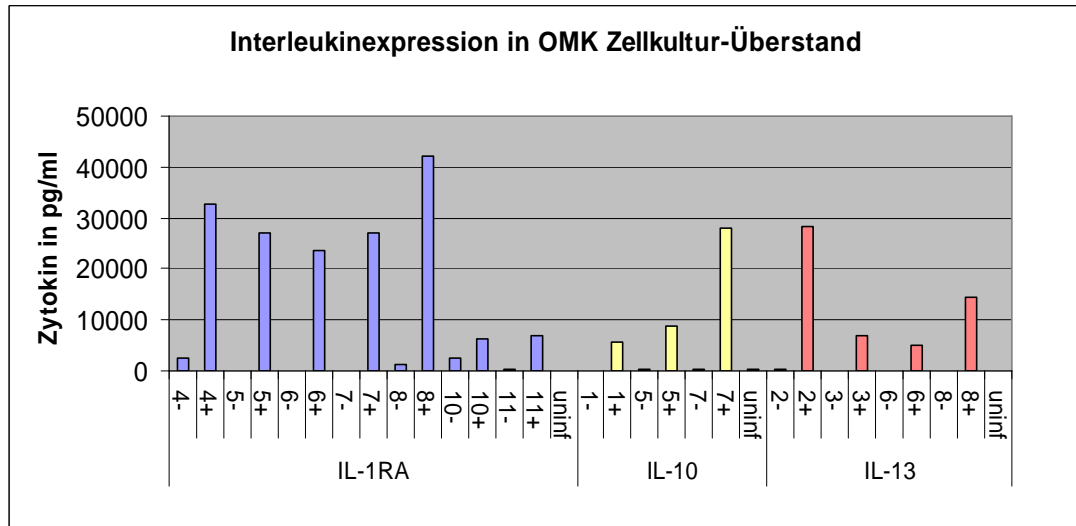


Abb. 9: Induzierbare Interleukinexpression durch attenuierte Vektoren in OMK Zellen. Die verschiedenen Vektoren sind gemäß ihrer Nummerierung aus Tabelle 1 aufgetragen. „-“ bedeutet uninduziert, „+“ bedeutet induziert. Vektoren mit zwei integrierten Interleukinkassetten sind zweimal, jeweils unter der Sparte des entsprechenden Interleukins, aufgeführt. Als Negativkontrolle diente Überstand von uninfectierten OMK Zellen.

In allen dargestellten Vektoren konnte eine gesteigerte Expression der jeweiligen Zytokine nach Induktion beobachtet werden. Zur Infektion wurden untitrierte, nicht standardisierte Virusmengen verwendet. Dies begründet die Variabilität in den exprimierten Interleukinmengen der verschiedenen Vektoren. Hierbei spielen auch Positionseffekte der inserierten Interleukine eine Rolle, wobei eine Insertion im linksterminalen Cosmid cos331 in der Regel zu einer höheren Interleukinexpression führt (z.B. IL-1RA und IL-10 Expression der Vektoren 5, 6, und 8). Dies korreliert mit Ergebnissen aus dem konstitutiven Vektorsystem (Stumpf 2003). Die zum Teil deutlichen basalen Expressionswerte im uninduzierten Zustand beruhen vermutlich auf der lytischen Virusreplikation. Dabei erfolgt ausgehend von viralen Promotoren eine Transkription viraler mRNA, welche die inserierten Zytokin-Expressionskassetten überlappen könnte und eventuell auch zu einer allgemeinen Aktivierung der zellulären Transkription führt (z.B. Vektor 4 und 10).

2.2.4.2. Das GeneSwitch™-Protein in OMK Zellen

Die Expression des GeneSwitch™-Proteins und dessen gesteigerte Expression infolge des positiven Rückkopplungsmechanismus des induzierbaren Expressionssystems wurde zur weiteren Charakterisierung für einige Vektoren untersucht. Exemplarisch ist hier Virus 1 dargestellt. Zu diesem Zweck wurden OMK Zellen infiziert, nach 24h induziert und weitere 24h danach geerntet. Die dabei erhaltenen Zell-Lysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, und die NFκB-p65 Untereinheit des GeneSwitch™-Proteins bzw. das zelluläre p65 mittels Western Blot detektiert (Abb. 10).

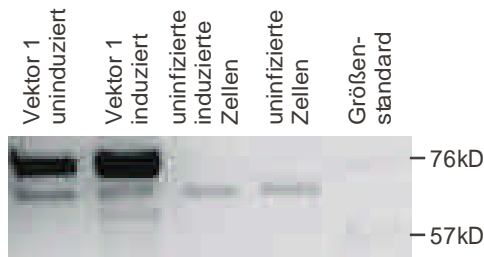


Abb. 10: Detektion der NFκB-p65 Untereinheit des GeneSwitch™-Proteins in OMK Zellen. Spur 1: Lysat aus mit Vektor 1 infizierten, uninduzierten Zellen, Spur 2: Lysat aus mit Vektor 1 infizierten, induzierten Zellen, Spur 3: Lysat aus uninfizierten, induzierten Zellen, Spur 4: Lysat aus uninfizierten Zellen, Spur 5: Biotinylierter Protein-Größenstandard.

Im Falle der infizierten Zellen sieht man eine deutliche Bande des 73kD großen GeneSwitch™-Proteins, das im induzierten Zustand aufgrund des positiven Rückkopplungsmechanismus des induzierbaren Expressionssystems vermehrt gebildet wird. Die schwache Bande in den Spuren 1-4 bei 65kD stellt die vom verwendeten Antikörper speziesunabhängig erkannte zelluläre p65 Untereinheit des Transkriptionsfaktors NFκB (RelA) dar. Die Zell-Lysate der uninfizierten Proben zeigen unabhängig vom Mifepristonzusatz keine Bande im Bereich von 73kD.

3. Untersuchungen zur Selektivität und Sensitivität des induzierbaren Expressionssystems im viralen Kontext

3.1. Selektivität in OMK und HFF Zellen

Induzierbare Expressionssysteme beruhen meist auf der selektiven Aktivierung oder Repression der Transgen-Expression durch eine spezifische, möglichst gut charakterisierte Induktionssubstanz. Wie bereits erläutert, ist dies im Falle des GeneSwitch™-Systems der Progesteronantagonist Mifepriston, auch bekannt als Wirkstoff zum intrauterinen Schwangerschaftsabbruch, RU486. Zur Aktivierung des Expressionssystems bindet diese Substanz an das Transaktivatorprotein, das daraufhin seine Konformation ändert, dimerisiert, an die entsprechenden DNA-Bindestellen bindet und die Expression des jeweiligen Transgens aktiviert (Abb. 1). Die Bindung an das GeneSwitch™-Protein erfolgt über eine carboxyterminal verkürzte Progesteron-Rezeptordomäne, welche durch diese Modifikation nur noch Progesteron-Antagonisten wie Mifepriston binden kann (Wang *et al.*, 1994). Um die Selektivität des Systems im Kontext des HVS zu charakterisieren, wurden OMK und HFF Zellen mit induzierbarem Vektor infiziert. Nach 24h wurden unterschiedliche Mengen an

Progesteron, dem ursprünglichen Liganden der unmodifizierten Rezeptordomäne, zugegeben. Anschließend wurden zu mehreren Zeitpunkten Überstandspuren entnommen und auf eine etwaige Expression des entsprechenden Transgens (Interleukins) untersucht (Abb. 11).

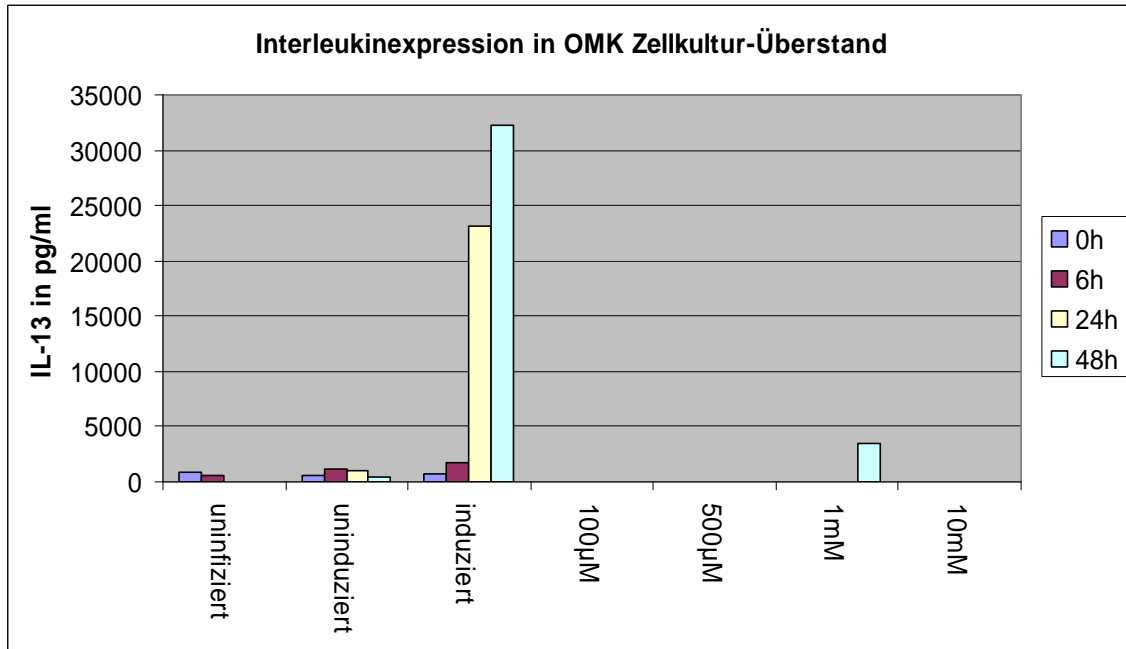


Abb. 11a: Selektiv induzierbare Interleukinexpression in OMK Zellen. OMK Zellen wurden mit Vektor 2 infiziert, und verschiedene Mengen an Progesteron (Endkonzentration von 100µM bis 10mM) zugegeben. Überstand uninfizierter Zellen diente als Negativkontrolle; der Überstand Mifepriston induzierter Zellen als Positivkontrolle. Überstandspuren wurden zu den Zeitpunkten 0, 6, 24 und 48h nach Induktion abgenommen und per ELISA untersucht.

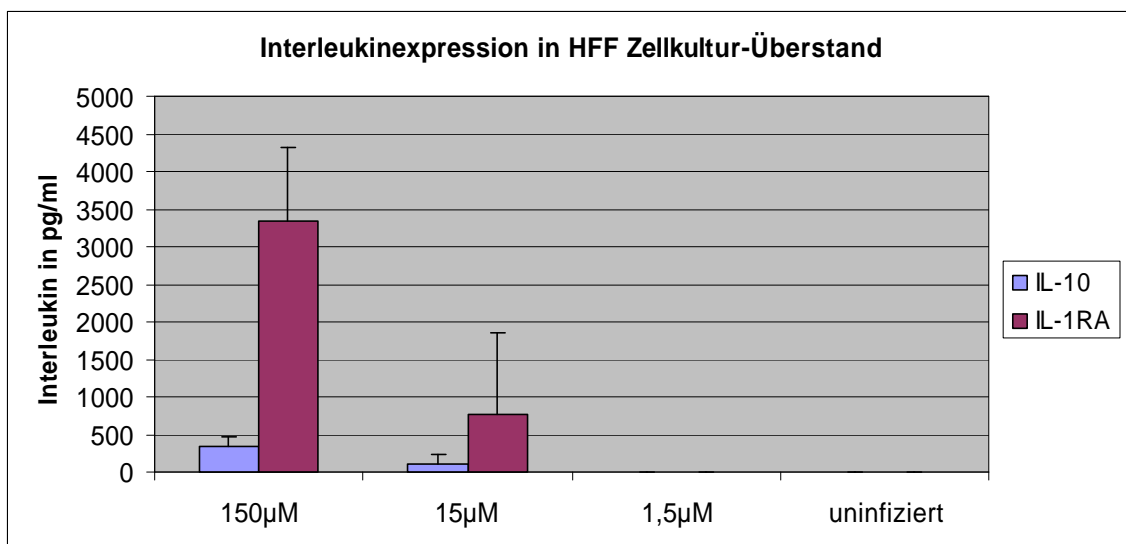


Abb. 11b: Selektiv induzierbare Interleukinexpression in HFF Zellen. HFF Zellen wurden mit Vektor 5 mit einer TCIP (moi) von 5 infiziert, und verschiedene Mengen an Progesteron (Endkonzentration von 1,5µM bis 150µM) zugegeben. Der Überstand uninfizierter Zellen diente als Negativkontrolle. Überstandspuren wurden 72h nach Induktion abgenommen und per ELISA untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Versuchsansätze.

Im Falle der OMK Zellen zeigte sich auch unter Verwendung hoher Progesterondosen weder IL-1RA noch IL-10 Expression, und damit keine meßbare Aktivierung des Expressionssystems. Im Gegensatz dazu konnte in der Mifepriston-behandelten Positivkontrolle 24h nach Induktion ein starker Anstieg der Interleukinexpression verzeichnet werden. Im humanen *in vitro* Testsystem mit HFF Zellen bewirkten Progesteron-Konzentrationen größer 1,5µM einen deutlichen Anstieg der Interleukinexpression. Diese nicht-selektive Aktivierung des Systems ist jedoch vor dem Hintergrund eines beim Menschen maximalen physiologischen Progesteron-Serumspiegels von 15-20µg/l (ca. 0,07µM) im dritten Trimenon der Schwangerschaft und postmenopausalen Serumwerten bzw. Serumwerten beim Mann kleiner 100ng/l höchstwahrscheinlich nicht relevant, da die verwendete minimale Progesteronkonzentration von 1,5µM damit mindestens 20-fach über physiologischen Werten liegt. Somit kann von einer selektiven Aktivierbarkeit des Expressionssystems vor physiologischen Hintergrund ausgegangen werden.

3.2. Sensitivität in OMK und HFF Zellen

Im Gegenzug ist auch die minimal notwendige Mifepristonkonzentration, die zu einer Aktivierung des Expressionssystems führt, bedeutsam, da sie keinerlei endogene, antagonistische Effekte auslösen sollte. Als Abortivum wird Mifepriston in einer Einzeldosis von 600mg bzw. 10mg/kg verabreicht, wobei maximale Serumspiegel im Bereich von $5,3 \pm 1,3\mu\text{M}$ nach 1-2h beschrieben sind (Sarkar 2002). Zur Abschätzung der therapeutischen Breite zwischen Aktivierung des Expressionssystems und unerwünschter Wirkung als Progesteronantagonist wurden sowohl OMK als auch HFF Zellen mit induzierbaren Vektoren infiziert, und verschiedene Konzentrationen an Mifepriston zugegeben. Überstandsporen wurden wiederum per ELISA auf erfolgte Interleukinbildung untersucht (Abb. 12). Dabei erwies sich eine Konzentration von 100pM in OMK und HFF Zellen bereits als ausreichend zur annähernd maximalen Aktivierung des induzierbaren Expressionssystems. Dies liegt mehr als 1000-fach unter der für antagonistische Wirkungen notwendigen Konzentration. Bei zu hoher Dosierung nimmt die Aktivierung des Systems wieder ab. Die deutliche Abnahme bei der Konzentration von 10µM beruht wahrscheinlich auf der Unlöslichkeit von Mifepriston in Wasser, so daß es bei Zugabe zur Zellkultur in dieser hohen Dosis zum Teil sichtbar wieder ausfällt, in ungelöster Form vorliegt und das System anscheinend nicht mehr aktivieren kann. Wie oben bereits erwähnt, beruhen die Unterschiede in der Expression der beiden Zytokine vermutlich auf Positionseffekten der inserierten Interleukine. Hierbei ist die Expression des im linksterminalen Cosmid cos331 inserierten Interleukins um Faktor 2 bis 8 höher.

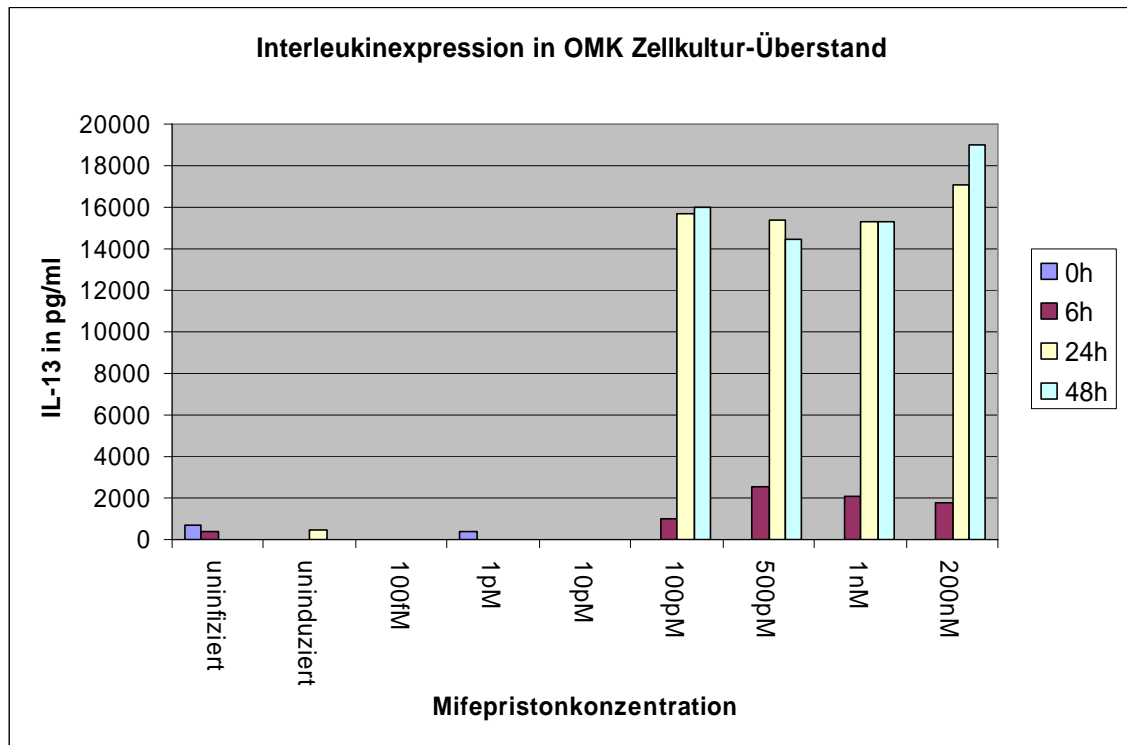


Abb. 12a: Bestimmung der minimalen Mifepristonkonzentration zur Aktivierung des induzierbaren Expressionssystems in OMK Zellen. OMK Zellen wurden mit Vektor 1 infiziert, und nach 24h verschiedene Mengen an Mifepriston zugesetzt (Endkonzentration 100fM bis 200nM). 0, 6, 24 und 48h nach Induktion wurden Überstandsproben entnommen und mittels ELISA die Interleukinexpression analysiert. Der Überstand uninfizierter Zellen diente als Negativkontrolle.

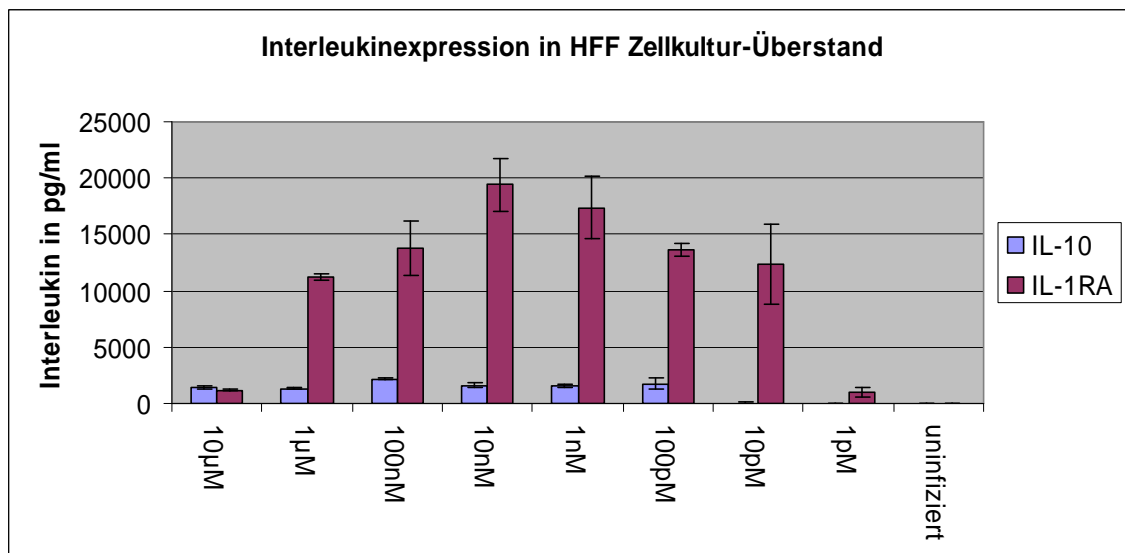


Abb. 12b: Bestimmung der minimalen Mifepristonkonzentration zur Aktivierung des induzierbaren Expressionssystems in HFF Zellen. HFF Zellen wurden mit Vektor 5 mit einer TCIP (moi) von 5 infiziert, und nach 24h verschiedene Mengen an Mifepriston zugesetzt (Endkonzentration von 10µM bis 1pM). Der Überstand uninfizierter Zellen diente als Negativkontrolle. Überstandsproben wurden 72h nach Induktion abgenommen und per ELISA auf die Expression der beiden Interleukine IL-1RA und IL-10 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchsansätzen.

4. Untersuchungen zur induzierbaren Interleukinexpression der Vektoren in humanen Fibroblasten

4.1. Induzierbare Interleukinexpression in HFF Zellen

4.1.1. Zeitverlauf der Interleukinexpression

Die Expression der Zytokine wurde zunächst in HFF Zellen im Zeitverlauf untersucht. HFF Zellen wurden in 6-well Platten mit Vektor 5 infiziert, 24h nach Infektion das Kulturmedium gewechselt und induziert. Überstandsproben wurden zu mehreren Zeitpunkten entnommen und per ELISA untersucht (Abb. 13). Zwischen 6h und 72h nach Induktion erfolgt ein starker Anstieg der Interleukinexpression. Diese nimmt danach kontinuierlich ab, ist jedoch auch nach 412h noch detektierbar (Abb. 13). Die Expression ist dabei abhängig von der Multiplizität der Infektion. Die basale Expression im uninduzierten Ansatz unterscheidet sich dabei nicht von der Negativkontrolle.

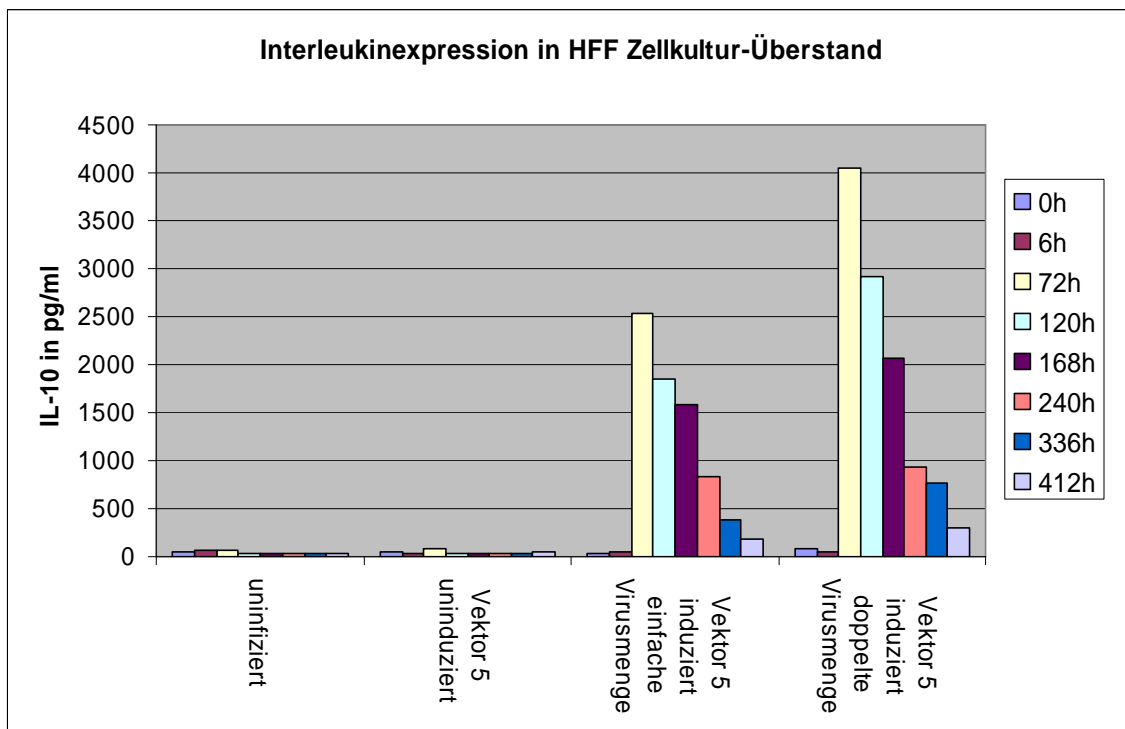


Abb. 13: Zeitverlauf der Zytokinexpression in HFF Zellen. HFF Zellen wurden mit Vektor 5 infiziert, nach 24h induziert, zu mehreren Zeitpunkten vor Induktion (0h) und nach Induktion (6, 72, 120, 168, 240, 336 und 412h) Überstandsproben entnommen und die Interleukinbildung per ELISA untersucht. Als Negativkontrolle diente der Überstand uninfizierter Zellen.

4.1.2. Expression des GeneSwitch™-Proteins

Auch im Falle der HFF Zellen wurde für einige Vektoren die positive Rückkopplung auf die Expression des GeneSwitch™-Proteins untersucht. Exemplarisch ist hier wiederum Virus 1 dargestellt. Die Zellen wurden infiziert, nach 24h induziert und nach weiteren 24h geerntet. Die erhaltenen Zell-Lysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, und wiederum die NF κ B-p65 Untereinheit des GeneSwitch™-Proteins mittels Western Blot detektiert (Abb. 14).

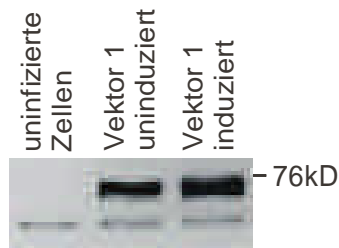
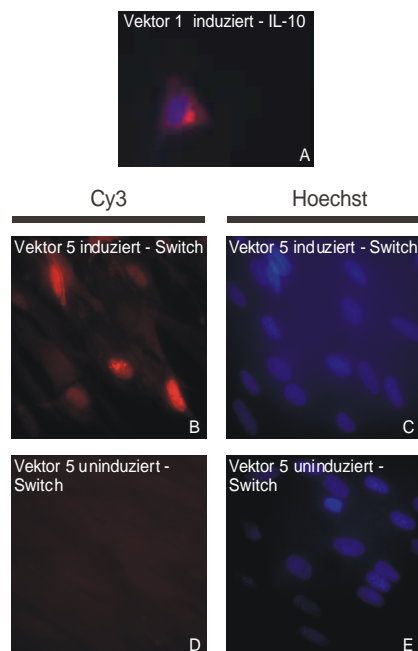


Abb. 14: Expression des GeneSwitch™-Proteins in HFF Zellen. Spur 1: Lysat aus uninfizierten Zellen, Spur 2: Lysat aus mit Vektor 1 infizierten, uninduzierten Zellen, Spur 3: Lysat aus mit Vektor 1 infizierten, induzierten Zellen, jeweils nach 24h. Unterhalb der GeneSwitch™-Bande ist die Bande der zellulären p65 Untereinheit sichtbar.

Analog zu den OMK Zellen (Abb. 10) erkennt man im Falle der infizierten HFF Zellen deutlich die Bande des 73kD großen GeneSwitch™-Proteins. Im induzierten Zustand ist 24h nach Induktion bereits eine leicht gesteigerte Bildung des GeneSwitch™-Proteins aufgrund des positiven Rückkopplungsmechanismus des induzierbaren Expressionssystems sichtbar. Die schwächere Bande bei 65kD stellt wiederum die zelluläre p65 Untereinheit des Transkriptionsfaktors NFκB (RelA) dar.

4.1.3. Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis

Sowohl die Interleukinexpression als auch die Expression des GeneSwitch™-Proteins lassen sich immunfluoreszenzmikroskopisch darstellen. Zu diesem Zweck wurden HFF Zellen infiziert, 24h nach Infektion induziert, und nach weiteren 24h der immunfluoreszenzmikroskopische Nachweis durchgeführt. In Abbildung 15A ist das Bild einer IL-10 Expression infolge Infektion mit Vektor 1 dargestellt. Eine Interleukinexpression konnte im uninduzierten Zustand nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Abbildungen 15B-E zeigen die



Expression des Transaktivatorproteins ohne und mit Induktion infolge Infektion mit Vektor 5. Aufgrund der fehlenden Detektierbarkeit des GeneSwitch™-Proteins im uninduzierten Zustand wird die Effizienz der positiven Rückkopplung des induzierbaren Expressionssystems deutlich.

Abb. 15: Immunfluoreszenzmikroskopische Detektion von IL-10 und des GeneSwitch™-Proteins in HFF Zellen. HFF Zellen wurden mit Vektor 1 (IL-10) bzw. Vektor 5 (GeneSwitch™) infiziert und nach 24h induziert. A) Darstellung der IL-10 Expression (Überlagerung aus Cy3-gefärbter IL-10 Expression und Kernfärbung mit Hoechst-33258). B) und D) Darstellung der GeneSwitch™-Protein Expression im induzierten und uninduzierten Zustand. C) und E) Kernfärbung mit Hoechst-33258 zur GeneSwitch™-Protein Expression.

4.2. Induzierbare Interleukinexpression in RASF Zellen

4.2.1. Zeitverlauf der Interleukinexpression

Um den zeitlichen Verlauf der Interleukinexpression zu charakterisieren, wurden RASF Zellen in gleicher Weise wie HFF Zellen mit Vektor 5 und zum Vergleich mit dem konstitutiven Vektor infiziert und gegebenenfalls induziert. Überstandsproben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion genommen und per ELISA untersucht (Abb. 16).

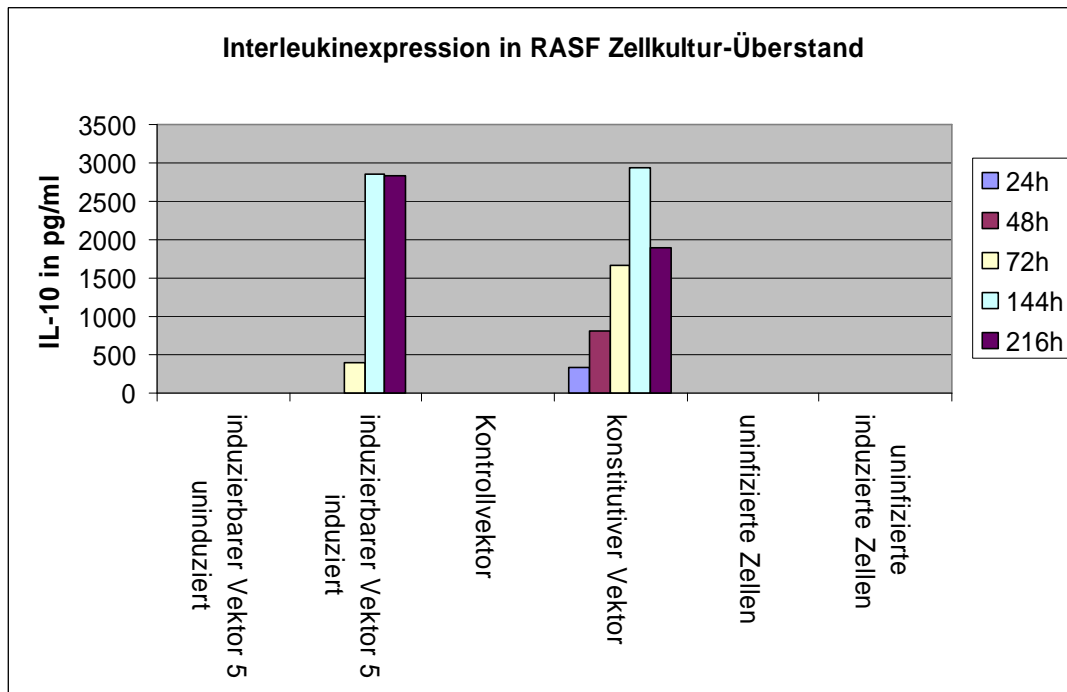


Abb. 16: Zeitverlauf der Interleukinexpression in RASF Zellen. RASF Zellen wurden mit Vektor 5, und konstitutivem Vektor mit einer moi/TCIP von 5 infiziert, nach 24h induziert, nach weiteren 24h, 48h, 72h, 144h und 216h Überstandsproben entnommen und per ELISA auf IL-10 Expression untersucht. Als Negativkontrolle diente Überstand Kontrollvektor infizierter, sowie unfizierter Zellen.

Das induzierbare Vektorsystem zeigt eine deutliche Interleukinexpression nach 72h. Dies korreliert mit den Daten aus Untersuchungen mit HFF Zellen. Verglichen mit dem konstitutiven Vektorsystem weist das induzierbare System eine etwas verzögerte Interleukinexpression auf, wobei sich dieser Effekt durch die vorher erforderliche Bildung und Aktivierung des GeneSwitch™-Proteins erklären lässt. Im konstitutiven Vektor ist analog zum induzierbaren Vektor bei Untersuchungen in HFF Zellen (Abb. 13) im weiteren Zeitverlauf eine Abnahme der Expression feststellbar. Im Falle des induzierbaren Systems kann dies hier jedoch noch nicht beobachtet werden. Uninfizierte und mit Kontrollvektor infizierte Zellen zeigen keine detektierbare IL-10 Expression.

4.2.2. Korrelation von Interleukinexpression und Virusmenge, sowie Einfluß zellulärer Parameter

Des Weiteren wurde der Einfluß von Virusdosis (TCIP, moi) und zellulären Parametern auf die Interleukinexpression untersucht. Hierzu wurden RASF Zellen verschiedener Spender und Passagen in 12-well Platten mit verschiedenen Virusdosen (moi 1 bis 9) des induzierbaren und konstitutiven Vektorsystems infiziert und wie beschrieben induziert. Überstandsproben wurden 7 Tage nach Induktion entnommen und per ELISA untersucht (Abb. 17).

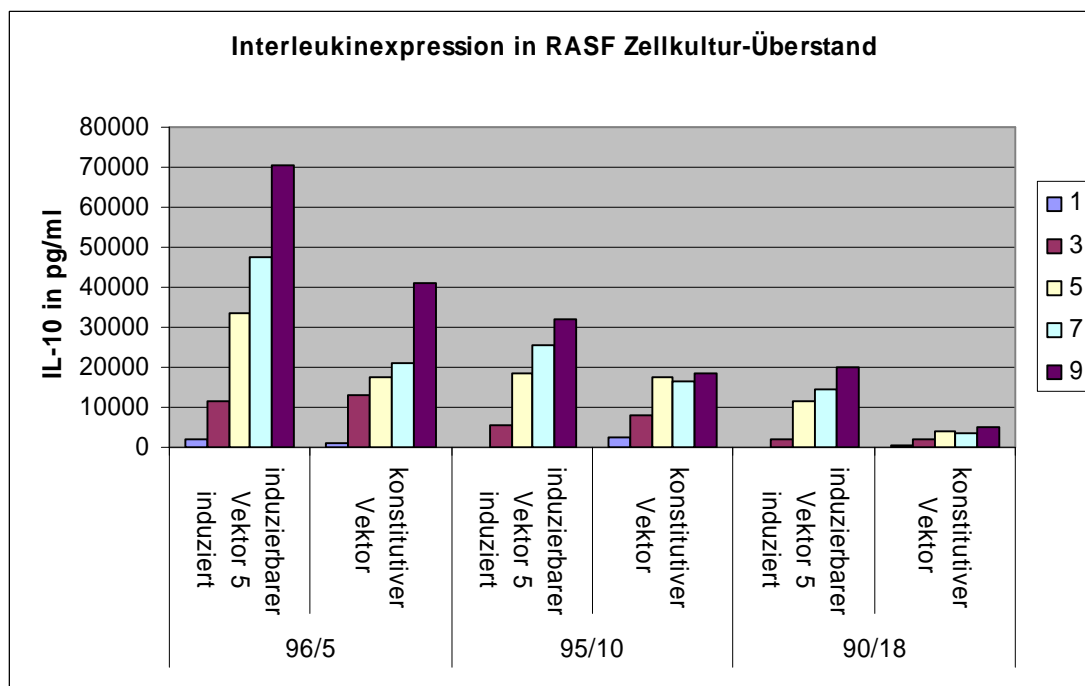


Abb. 17: Einfluß von Virusdosis und zellulären Parametern auf die Interleukinexpression. RASF Zellen (x/y) verschiedener Spender (x) und Passagen (y) wurden mit verschiedenen Virusmengen (moi 1-9, siehe Legende) infiziert, nach 24h induziert, nach weiteren 7 Tagen Überstandsproben entnommen und per ELISA auf die IL-10 Expression untersucht. Überstände uninfizierter und uninduzierter Zellen zeigten keine detektierbare IL-10 Expression (Daten nicht gezeigt).

In allen Zellen und Vektoren zeigte sich eine Korrelation zwischen Vektordosis und Interleukinexpression, sowie eine höhere Expression des induzierbaren, verglichen mit dem konstitutiven System. Zelluläre Parameter wie die Passagenzahl scheinen dabei mit einer Abnahme der Interleukinexpression einherzugehen, was mit Beobachtungen der Arbeitsgruppe Müller-Ladner, Uniklinikum Regensburg korreliert (persönliche Mitteilung von Dr. E. Neumann). Bei höheren Vektordosen (moi>9) waren zunehmend toxische Effekte beobachtbar, wobei hier wiederum die älteren Passagen empfindlicher schienen. Zu deren Vermeidung wurde deshalb in den folgenden Versuchen eine moi von 5 als Vektordosis gewählt, sowie möglichst junge Passagen von RASF Zellen verwendet.

4.2.3. RT-PCR

Die Expression der Transgene sollte in RASF Zellen auch auf RNA-Ebene überprüft werden. Deshalb wurden diese mit induzierbarem Vektor, konstitutivem Vektor oder Kontrollvektor mit einer moi von 5 infiziert und wie beschrieben induziert. Zu den Zeitpunkten 7 und 28 Tage nach Induktion wurde die Gesamt-RNA der Zellen präpariert und eine RT-PCR durchgeführt (Abb. 18).

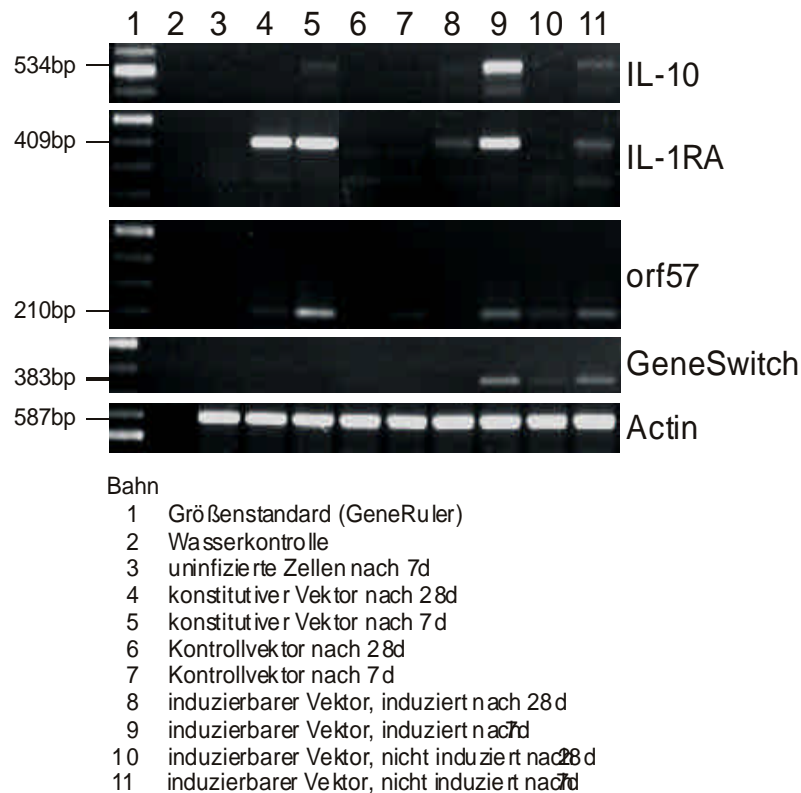


Abb. 18: Transkription der Transgene in RASF Zellen. RASF Zellen wurden mit induzierbarem, konstitutivem Vektor oder Kontrollvektor mit einer moi von 5 infiziert und gegebenenfalls induziert. Die Gesamt-RNA wurde zu den Zeitpunkten 7 und 28 Tage nach Induktion präpariert, und damit eine RT-PCR durchgeführt. Rechts ist die jeweilige Ziel-mRNA des Ansatzes bezeichnet. Es wurde die RNA der beiden Interleukine, des GeneSwitch™-Proteins, sowie des viralen *orf57*, als Kontrolle der Infektion detektiert. Als Kontrolle wurde zelluläre β -Actin mRNA amplifiziert. Links ist die Größe der erwarteten Bande dargestellt. Die helle Bande des Größenstandards in Bahn 1 entspricht 500bp.

Die Expression des HVS *orf57* wurde als Kontrolle der Infektion untersucht. Sie ist in den infizierten Proben (außer in Bahn 6 und 8, Zeitpunkt 28d nach Induktion) sichtbar. Die Abnahme im Zeitverlauf kann durch den postulierten Latenzmechanismus (Schäfer *et al.*, 2003; Thureau *et al.*, 2000; Whitehouse *et al.*, 1998b; Whitehouse *et al.*, 1998a) und durch die Infektionsrate der Zellen zwischen 70-80% erklärt werden. Sowohl für den induzierbaren als auch den konstitutiven Vektor ist mRNA für die Zytokine IL-1RA und IL-10 nachweisbar. Sie nimmt jedoch, außer für IL-1RA im konstitutiven Vektor, im Zeitverlauf ab. Dasselbe kann auch für die GeneSwitch™ mRNA des induzierbaren Vektorsystems beobachtet werden, wobei die mRNA-Bildung wie erwartet unabhängig vom Induktionszustand erfolgt. Der Nachweis geringer Zytokin-mRNA Mengen im Falle des induzierbaren Vektorsystems im uninduzierten Zustand (Tag 7) reflektiert die hohe Sensitivität der PCR. Auf Proteinebene war diese geringe basale Transkription nicht detektierbar (siehe Abb. 19).

5. Reinduzierbarkeit des induzierbaren Systems *in vitro*

5.1. Interleukinexpression in humanen Fibroblasten

Hier sollte geklärt werden, ob sich die nach Erstinduktion wieder abnehmende Interleukinexpression nach einem gewissen Zeitraum durch erneute Mifepristongabe reaktivieren läßt. Es wurden HFF Zellen verschiedener Passagen in 6-well Platten mit induzierbarem Vektor 5 infiziert (moi 5) und induziert. In einem Teil der Ansätze erfolgte eine Reinduktion 13 Tage nach Erstinduktion. Überstandsproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen und per ELISA analysiert (Abb. 19 und 20). Beide Passagen zeigten eine deutliche Interleukinexpression von 7-8ng/ml für IL-1RA bzw. 0,85-2,5ng/ml für IL-10 nach Erstinduktion bei gleichzeitig sehr niedrigem Hintergrund. Ein Einfluß der Passagenzahl wie im Falle der RASF Zellen war hier nicht beobachtbar. Das Expressionsmaximum wurde für beide Zytokine nach 5 Tagen erreicht und sank dann bis zum Versuchsende ab. Ein Effekt der Reinduktion nach 13 Tagen konnte nicht detektiert werden.

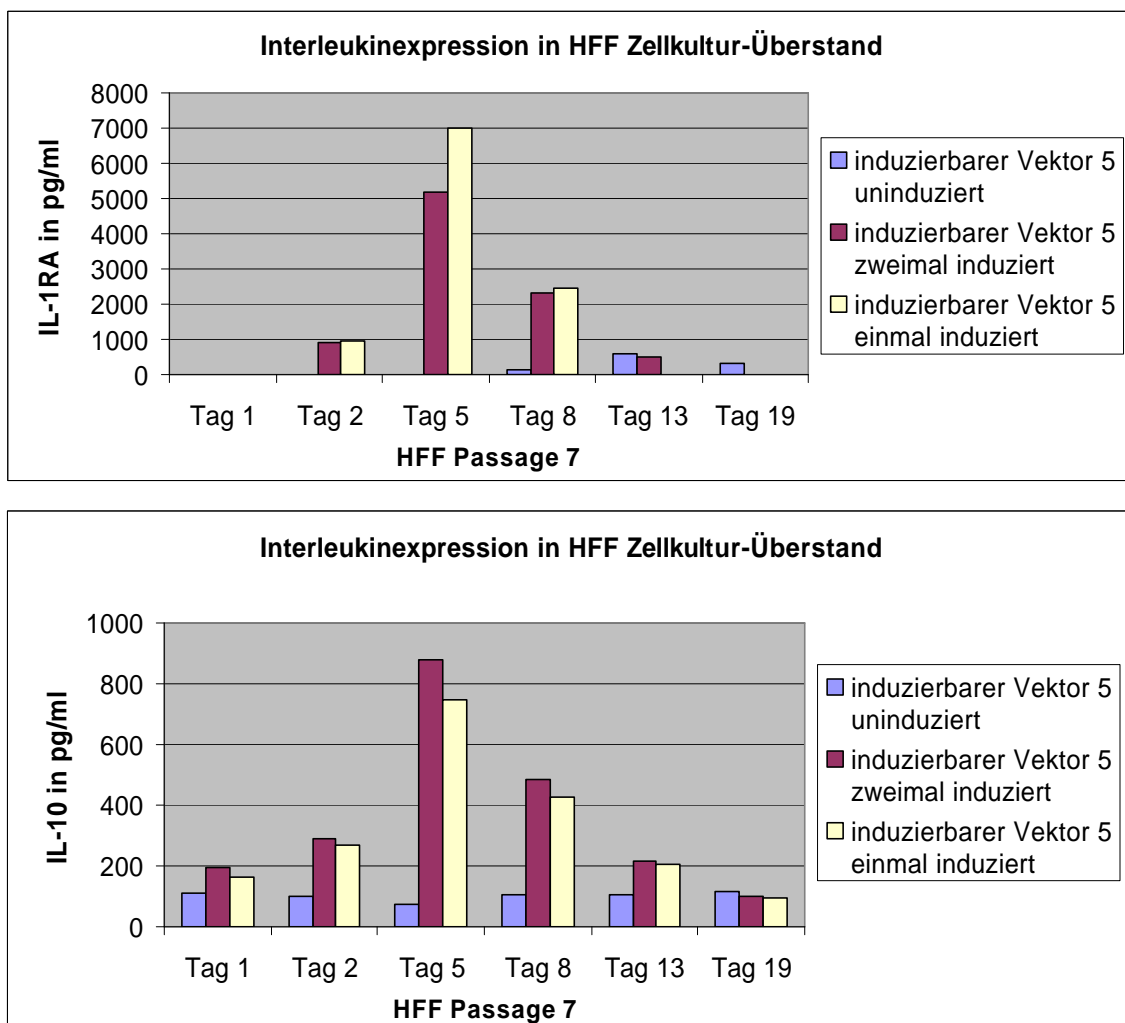


Abb. 19 Versuch zur Reinduktion der Interleukinexpression in HFF Zellen der Passage 7. HFF Zellen wurden mit moi 5 infiziert, induziert und zu verschiedenen Zeitpunkten Überstandsproben entnommen. Nach 13 Tagen erfolgte ein kompletter Mediumwechsel und zum Teil eine Reinduktion der Ansätze mit 2µl 1mM Mifepristonlösung (= zweimal induziert, dunkelrote Balken).

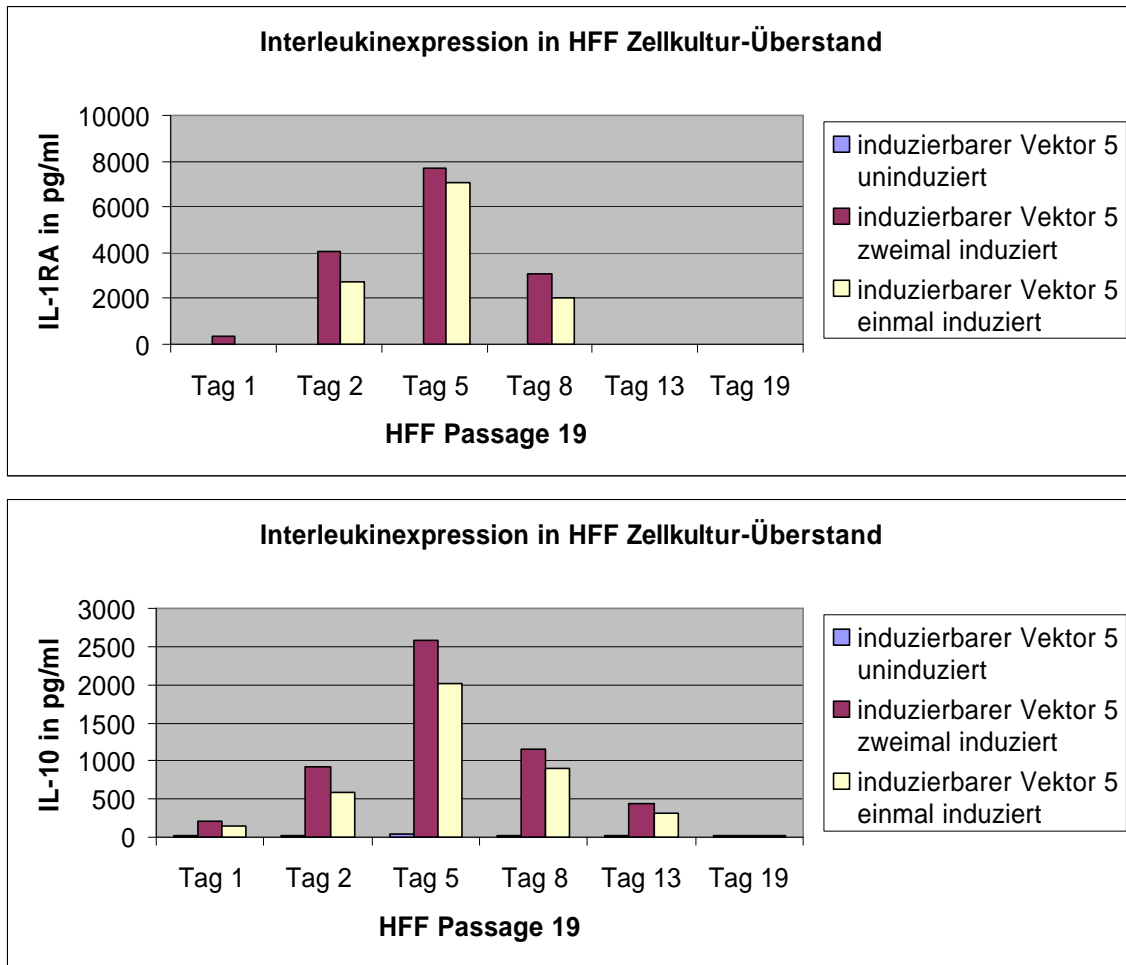


Abb. 20: Reinduktion der Interleukinexpression in HFF Zellen der Passage 19. Die HFF Zellen wurden mit moi 5 infiziert, induziert und zu verschiedenen Zeitpunkten Überstandsproben entnommen. Nach 13 Tagen erfolgte ein kompletter Mediumwechsel und zum Teil eine Reinduktion mit 2µl 1mM Mifepristonlösung der Ansätze (= zweimal induziert, dunkelrote Balken).

Das Reinduktionsverhalten des induzierbaren Systems wurde zur Bestätigung obiger Ergebnisse auch in RASF Zellen untersucht. Dabei wurde ein längerer Untersuchungszeitraum zugrunde gelegt, und in einem Teil der Ansätze nach jeder Probennahme eine Reinduktion durchgeführt. Die Zellen wurden mit induzierbarem, konstitutivem Vektor oder Kontrollvektor infiziert (moi 5), zu verschiedenen Zeitpunkten Überstandsproben entnommen, und diese per ELISA untersucht (Abb. 21).

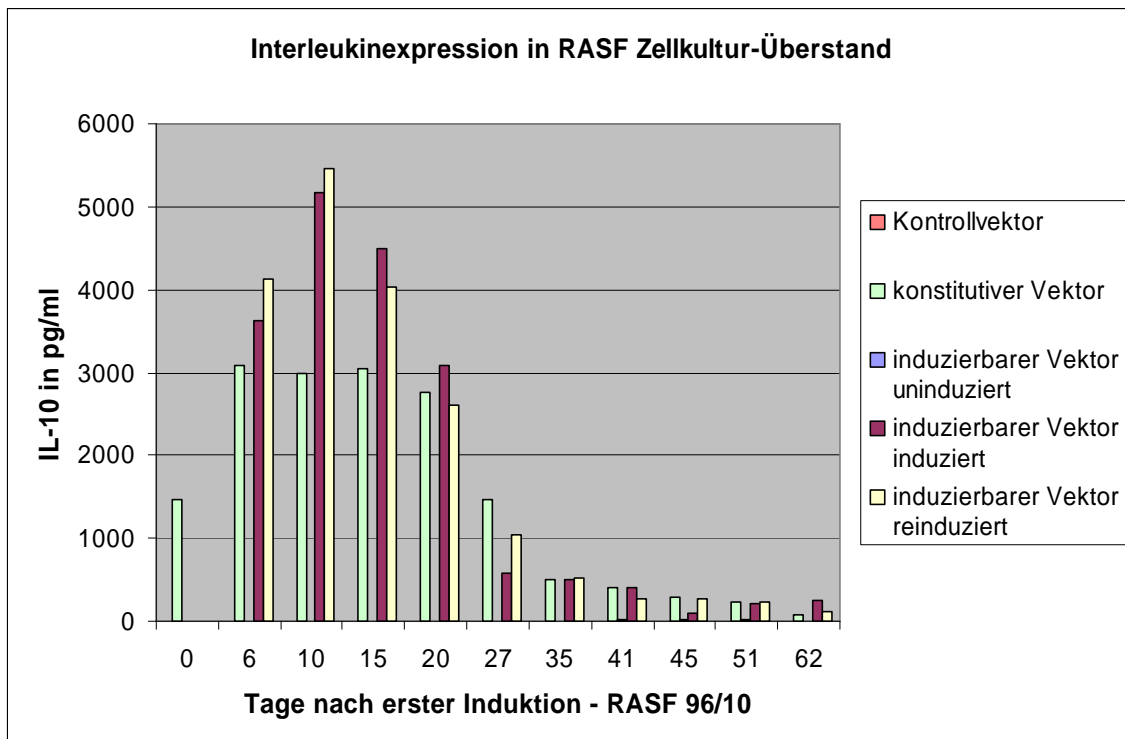


Abb. 21: Reinduzierbarkeit der Interleukinexpression in RASF Zellen. RASF Zellen wurden mit induzierbarem, konstitutivem Vektor oder Kontrollvektor mit gleicher *moi* von 5 infiziert, induziert, und zu den abgebildeten Zeitpunkten Überstandsproben entnommen. Eine Reinduktion erfolgte im Falle des gelb dargestellten Versuchsansatzes bei jeder Probennahme.

Auch hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg der induzierbaren Interleukinexpression, der bei 5ng/ml sein Maximum erreichte und danach wieder abflachte. Eine Expression von mehr als 500pg/ml konnte bis zum Tag 35 gemessen werden. In diesem Experiment übertraf das Expressionsmaximum des induzierbaren Systems das des konstitutiven Systems um ca. 2ng/ml. Der Kontrollvektor und uninduzierte Zellen zeigten keine Interleukinexpression (Daten z.T. nicht gezeigt). Ein Unterschied zwischen reinduzierten Zellen und nicht reinduzierten Zellen war nicht zu beobachten. Dies läßt darauf schließen, daß auch in RASF Zellen keine erfolgreiche Reinduktion *in vitro* erfolgte.

5.2. Bildung des GeneSwitch™-Proteins

Eine fehlende Expression des Transaktivatorproteins kann ein möglicher Grund für ein Ausbleiben der reinduzierbaren Interleukinexpression sein. Um dies zu analysieren, wurden RASF Zellen mit induzierbarem Vektor infiziert und z.T. induziert bzw. reinduziert. Die Reinduktion erfolgte 168h (7d) nach Erstinduktion. Die Zellen parallel behandelte Ansätze wurden nach 24, 72, 144 und 216h einer RIPA-Lyse unterzogen, und das gebildete GeneSwitch™-Protein anschließend im Western Blot mittels eines anti-human-NFκB-p65 Primärantikörpers und eines anti-Kaninchen-IgG Sekundärantikörpers nachgewiesen (Abb. 22).

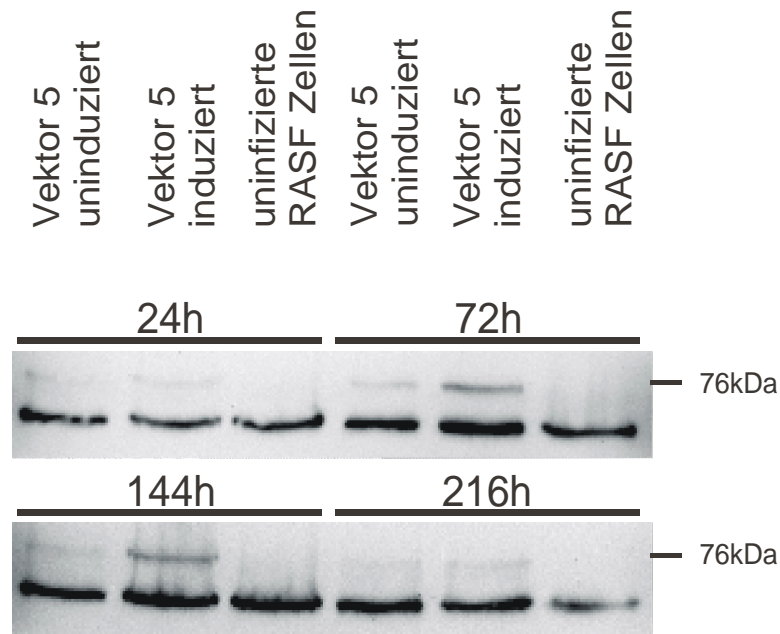


Abb. 22: Nachweis des GeneSwitch™-Proteins in RASf Zellen. RASf Zellen wurden mit Vektor 5 und einer moi von 5 infiziert und induziert. Eine Reinduktion erfolgte nach 168h. Nach 24, 72, 144 und 216h wurden die Ansätze geerntet, die Gesamtproteinmenge bestimmt, und je 10µg Zell-Lysat gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion des GeneSwitch™-Proteins erfolgte mittels Western Blot. Als Negativkontrolle dienten uninfizierte Zellen. Uninduzierte, infizierte Zellen dienten dazu, eine gesteigerte GeneSwitch™-Protein-Bildung infolge des positiven Rückkopplungsmechanismus des Expressionssystems zu verdeutlichen. Unterhalb der GeneSwitch™-Protein Banden ist wiederum eine Bande entsprechend zellulärem p65 sichtbar.

Aus obiger Abbildung wird ersichtlich, daß die GeneSwitch™-Protein-Expression 144h nach Erstinduktion ihr Maximum erreicht. Dabei ist, wie erwartet, ein deutlicher Unterschied zwischen induzierten und uninduzierten Zellen feststellbar. Auch nach 216h – also 48h nach Reinduktion – ist noch GeneSwitch™-Protein detektierbar, wobei hier ein schwacher Unterschied zwischen induziertem und uninduziertem Zustand sichtbar ist. Verglichen mit der Erstinduktion führt die Reinduktion jedoch zu keiner deutlichen Steigerung der GeneSwitch™-Protein Bildung mehr.

6. Problematik der sekundär induzierten Interleukinexpression

Verschiedene Ursachen der fehlenden Reinduzierbarkeit kommen vor dem Hintergrund der zwar abnehmenden, aber noch detektierbaren GeneSwitch™-Protein Expression in Frage:

1. Ein Verlust des Vektors im Zeitverlauf
2. Eine, durch die reprimierte GeneSwitch™-Expression ausgelöste, Inhibition der Transgenexpression. Hierbei ist eine Methylierung von Promotoren (in diesem Falle des Thymidinkinase-Promotors von *Herpesvirus simplex*, siehe auch Abb. 1) ein möglicher, häufig für eine Herunterregulation der Transgenexpression verantwortlicher, zellulärer Regulationsmechanismus.
3. Eine verminderte Interleukinexpression infolge fehlender Aktivierung der Expression durch das Transaktivatorprotein

6.1. Vektorpersistenz in humanen Fibroblasten

Ein weitgehender Verlust des episomalen HVS-Vektors im Zeitverlauf ist aufgrund bisheriger Untersuchungen zur Persistenz von *Herpesvirus saimiri* als Ursache für ein Ausbleiben der sekundären Interleukinexpression nicht wahrscheinlich (Grassmann und Fleckenstein 1989; Simmer *et al.*, 1991). Um dies zu bestätigen wurden HFF und RASF Zellen in gewohnter Weise mit induzierbarem, konstitutivem Vektor oder Kontrollvektor infiziert und induziert. Nach 7 und 28 Tagen wurde die Gesamt-DNA der Zellen präpariert, und mittels einer quantitativen *Real-time* PCR die vorhandene Vektorkopienzahl pro Zelle anhand des Verhältnisses von viralen MCP (*orf25*) - Kopien zur Hälfte der zellulären CCR5 Kopien berechnet (Abb. 23). Die Mittelwerte wurden aus jeweils zwei Meßwerten zweier unabhängiger Meßreihen gebildet.

In beiden Zellarten ergab sich für alle zytokinhaltigen Vektoren eine Reduktion der Kopienzahl im Zeitverlauf. In allen Fällen konnte jedoch 28 Tage nach Infektion noch eine Kopienzahl von mindestens 3-4 pro Zelle detektiert werden. Uninfizierte Zellen wiesen keine Vektorkopien auf. Schwankungen zwischen den Zelltypen beruhen vermutlich auf der variablen durchschnittlichen Infektionsrate zwischen 70-80% und den unterschiedlichen zellulären Charakteristika (siehe Einfluß der Passagenzahl auf die Interleukinexpression in RASF und HFF Zellen, Abb. 17 und 19/20). Der Verlust des episomal vorliegenden Virusgenomes als Ursache für das Ausbleiben der sekundär induzierbaren Interleukinexpression kann im Hinblick auf den positiven *orf57* Nachweis, 29 Tage nach Infektion in der RT-PCR, als alleinige Ursache der oben erwähnten Problematik somit höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden.

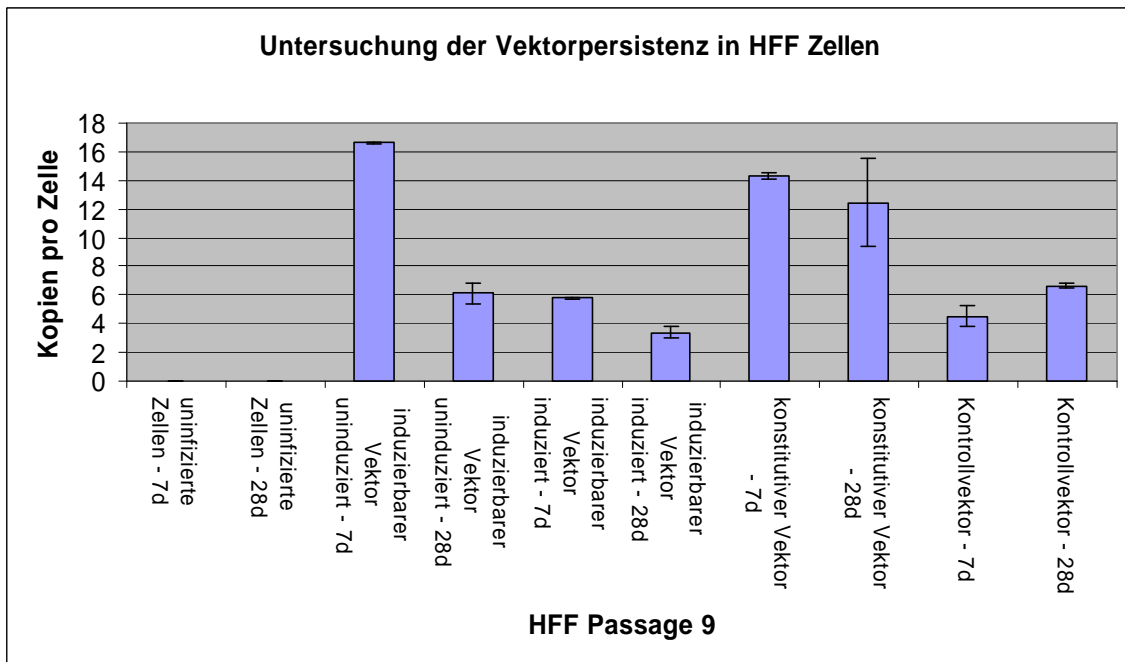


Abb. 23a: Persistenz der Vektoren in HFF Zellen. HFF Zellen wurden mit induzierbarem, konstitutivem Vektor oder Kontrollvektor mit einer moi von 5 infiziert und induziert. Nach 7 und 28 Tagen wurden die Ansätze geerntet, und aus 250ng Gesamt-DNA in *Real-time* PCR Reaktionen die Zahl der viralen Kopien pro Zelle anhand des Verhältnisses von viralen *orf25* (MCP) zur Hälfte der CCR5 Kopien pro Zelle bestimmt. Als Negativkontrolle dienten uninfizierte Zellen.

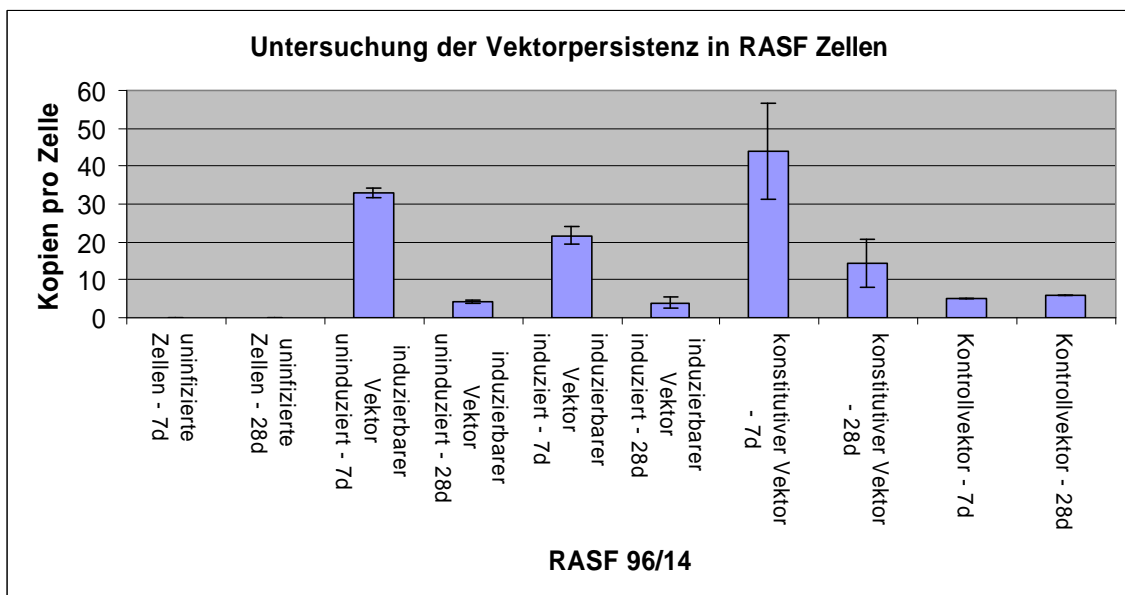


Abb. 23b: Persistenz der Vektoren in RASF Zellen. Die Durchführung erfolgte analog zu den HFF Zellen in RASF Zellen (Passage 14, Spender 96).

6.2. Promotoren zur GeneSwitch™-Protein Expression

DNA-Methylierung, insbesondere an CpG-Dinukleotiden, wird neben der Modifikation von Histonen als eine wesentliche Ursache epigenetischer Beeinflussung der Genexpression, auch von Transgenen (hier des GeneSwitch™-Proteins), angesehen. Dabei sind die regulatorischen Regionen, also Enhancer und Promotor der jeweiligen Gene, von besonderer Bedeutung. Im Falle des GeneSwitch™-Proteins wird der Thymidinkinase (Tk)-Promotor aus *Herpesvirus simplex* verwendet (Abb. 1), für den eine zeitabhängige

Herunterregulation der Transgenexpression im methylierten Zustand beschrieben ist (Kass *et al.*, 1997). Um zu klären, ob eine Deaktivierung des Tk-Promotors eine Rolle bei der ausbleibenden Reinduktion spielt, wurde dieser im pSwitch-Plasmid durch nachfolgend beschriebene Promotoren ersetzt. Diese Promotoren zellulärer Haushaltsgene sollten weniger methylierungsempfindlich sein und eine langanhaltende Expression gewährleisten (Abb. 24):

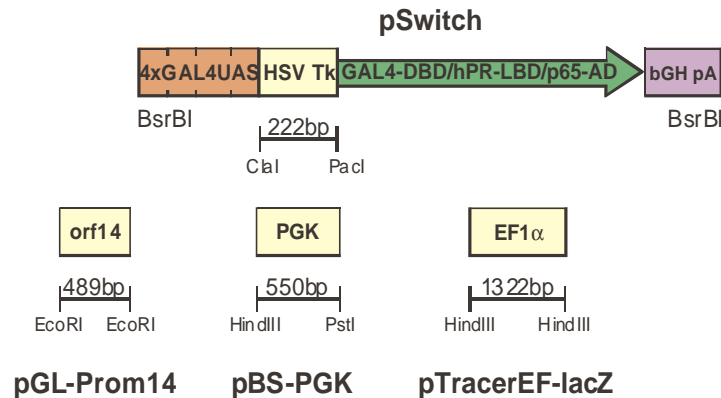


Abb. 24: Austausch des GAL4UAS/Herpes simplex Thymidinkinase-Hybridpromotors. Der Herpesvirus simplex Tk-Promotor wurde aus dem pSwitch-Plasmid mittels der Restriktionsenzyme ClaI und PacI herausgeschnitten und durch entsprechende Promotoren aus den Plasmiden pGL-Prom14, pBS-PGK und pTracerEF-lacZ ersetzt.

- Promotor der humanen Phosphoglycerat-Kinase
Die Phosphoglycerat-3 Kinase (PGK) ist ein essentielles Enzym der Glykolyse. Das kodierende Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und stellt ein sogenanntes Haushaltsgen dar. Der Promotor besitzt vier Kopien des Hexadeoxynukleotids 5'-GGGCGG-3', einer potentiellen Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor SP-1, eine 5'-CAAT-3' Sequenz, jedoch keine TATA-Box. Eine Hypermethylierung, und damit Regulation des Promotors, ist möglich und spielt vermutlich bei der Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms in der weiblichen Embryonalentwicklung eine Rolle (McBurney *et al.*, 1991). In lentiviralen Vektoren kann eine langanhaltende Transgenexpression beobachtet werden (Ramezani *et al.*, 2000).
- Promotor des humanen Elongationsfaktors 1 α
Der Elongationsfaktor-1 α (EF-1 α) ist ebenfalls ein Haushaltsgen. Das resultierende Enzym katalysiert die GTP-abhängige Bindung der Aminoacyl-tRNA an Ribosomen und kommt reichlich in nahezu allen Zellen vor. Eine starke Promotoraktivität, eine persistierende Expression von EF-1 α -Promoter gesteuerten Transgenen und eine mögliche Methylierung GC-reicher Promotorstrukturen in Abhängigkeit zum jeweiligen Transgen sind beschrieben (Chevalier-Mariette *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1990).

- Promotor des Leserrahmens *orf14* von *Herpesvirus saimiri*

HVS *orf14* codiert für ein virales Superantigen, welches die Proliferation von T-Zellen unterstützen soll. Das *orf14* Transkript kann in HFF Zellen per RT-PCR auch noch 28 Tage nach Infektion nachgewiesen werden (Stumpf 2003). Der Promotor ist CpG-arm; eine Regulation durch Methylierung ist bisher nicht untersucht.

Bei der Klonierung wurde der Tk-Promotoranteil durch Restriktionsenzymverdau entfernt, die Enden des verbleibenden pSwitch-Plasmids mit T4-Polymerase geglättet und dephosphoryliert. Die zu inserierenden Fragmente wurden per Restriktionsenzymverdau aus den Ursprungsplasmiden herausgeschnitten, geglättet, elektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Agarosegel extrahiert und mittels Phenol-Chloroform-Fällung aufgereinigt. Die Promotor-Fragmente wurden in das pSwitch Plasmid einligiert, und die Ligationsprodukte in chemisch kompetente *E. coli XL-1 Blue* mittels Hitzeschock eingebracht. Die verschiedenen pSwitch-Kassetten wurden dann in die *SwaI*-Schnittstelle des Cosmids cos331dBst1107IIacZ integriert. Im Anschluß erfolgte die Insertion der IL-1RA-Expressionskassette in die *PmeI* Schnittstelle des Polylinkers (siehe auch Abb. 3). Die so modifizierten Cosmide wurden nach Vermehrung und DNA-Präparation per Restriktionsenzymverdau mit *EcoRI* und *EcoRV* überprüft (Abb. 25). In allen Ansätzen stimmte das erwartete mit dem tatsächlichen Bandenmuster überein.

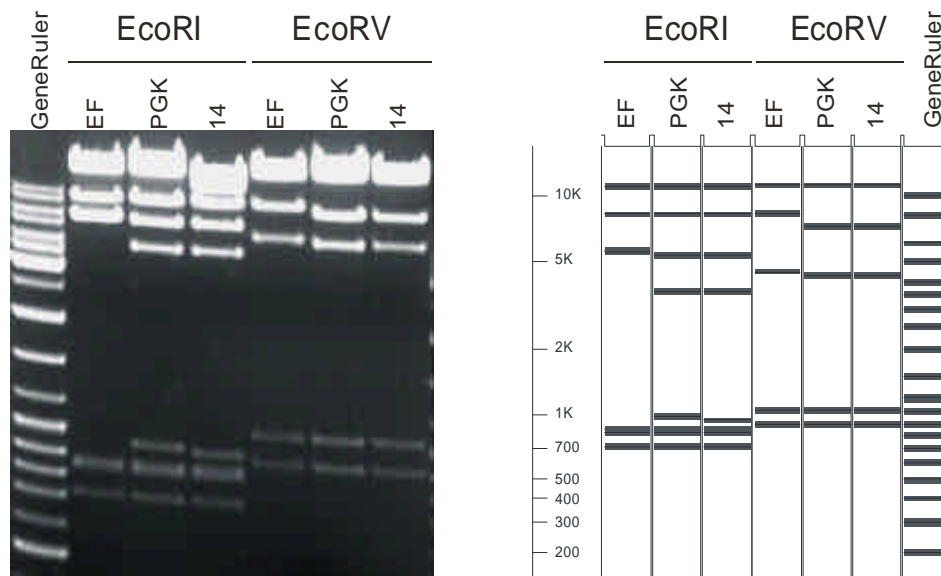


Abb. 25: Verifizierung der Promotor-modifizierten Cosmide durch Restriktionsenzymverdau mit *EcoRI* und *EcoRV* – Gelphoto nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 1%-igen Agarosegel. Die verschiedenen Cosmide cos331dBst1107IIacZSwitchXY-IL-1RA sind mit dem jeweils inserierten Promotor beschriftet. Rechts neben dem Gelphoto ist zum Vergleich das zu erwartende Bandenmuster der Spaltung abgebildet (mit *Vector NTi* simulierter Restriktionsverdau).

Die Vektorgewinnung erfolgte durch homologe Rekombination nach Lipofektion von fünf überlappenden Cosmiden in permissive OMK Zellen (Tab. 2). Die weitere Vektorvermehrung erfolgte in Analogie zu den vorher beschriebenen Vektoren.

Nr.	linksterminales Cosmid	Grundgerüst-Cosmide			rechtsterminales Cosmid
		261	291	336	
13	331dBst1107IIacZSwitch14 - IL-1RA	261	291	336	Dc5d71727475lacZ-IL-10
14	331dBst1107IIacZSwitchEF - IL-1RA	261	291	336	Dc5 d71727475lacZ-IL-10
15	331dBst1107IIacZSwitchPGK - IL-1RA	261	291	336	Dc5d71727475lacZ-IL-10

Tabelle 2: Übersicht der hergestellten rekombinanten Vektoren mit alternativen Promotoren. Die Nummerierung der Vektoren wird in analoger Weise weiterverwendet.

Die neuen Vektoren wurden mittels PCR auf das Vorhandensein sowohl der inserierten Interleukin- und GeneSwitch™-Kassetten, als auch des viralen *orf03* Gens (virales Homolog der Formylglycinamidribotidamido-transferase, FGARAT, E.C. 6.3.5.3) untersucht (Abb. 26) Alle Vektoren enthalten die entsprechenden Kassetten für das Transaktivatorprotein und die Interleukingene. Für den *orf14* Promotor und den EF-1 α Promotor standen zusätzlich Primerpaare zum direkten Nachweis des Promotorfragmentes zur Verfügung.

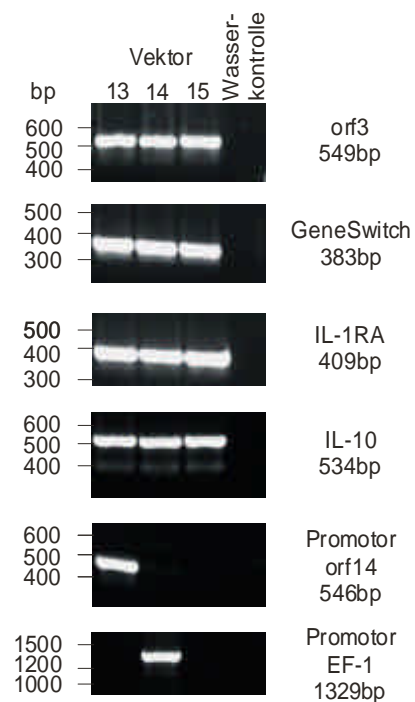


Abb. 26: Vektoren mit alternativen Promotoren vor dem GeneSwitch™. Die Vektoren wurden gemäß Tabelle 2 nummeriert. Es wurde sowohl das Vorhandensein der Interleukine, des GeneSwitch™-Anteils und die Promotorregion für den *orf14* und EF-1 α Promotor überprüft. Im Falle des PGK-Promotors waren keine passenden Primer vorhanden. Auf eine Detektion wurde in diesem Fall nach positiver Interleukinexpression verzichtet. Die erwartete Bandengröße der PCR-Produkte ist rechts unter der PCR-Beschriftung dargestellt.

Um die neuen Vektoren auf ihr Reinduktionsverhalten hin zu testen, wurden HFF Zellen mit einer moi von 5 infiziert, induziert, und nach 7 und 19 Tagen Überstandsproben entnommen. Ein Teil der Ansätze wurde dabei 7 Tage nach Erstinduktion reinduziert. Die Interleukinexpression wurde per ELISA detektiert (Abb. 27). In allen Ansätzen waren die

Expressionswerte nicht reinduzierter und reinduzierter Ansätze nach 19 Tagen annähernd identisch. Die Verwendung alternativer Promotoren für die Expression des GeneSwitch™-Proteins führte somit nicht zu einer gesteigerten, sekundären Interleukinexpression nach Reinduktion. Bemerkenswert ist, daß die Zytokin-Expression aller drei Vektoren das mit dem ursprünglichen Vektor mit HSV-Tk-Promotor im pSwitch-Anteil erzielte Maximum übertrafen. Dies läßt durchaus zumindest initial einen direkten Zusammenhang zwischen der Menge des exprimierten GeneSwitch™-Proteins und der Interleukinexpression vermuten. Eine im Zeitverlauf identische negative Regulation der verschiedenen Promotoren durch Methylierung und eine hierdurch ausbleibende sekundäre Interleukinexpression infolge GeneSwitch™-Protein Mangels erscheint jedoch unwahrscheinlich.

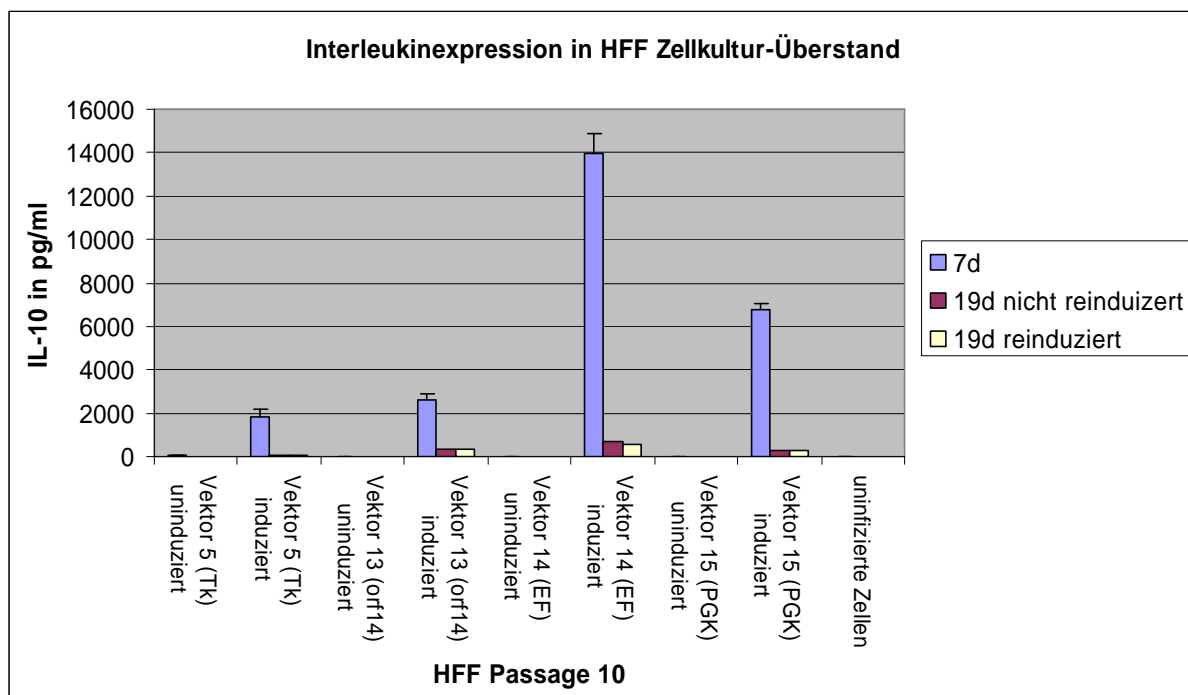


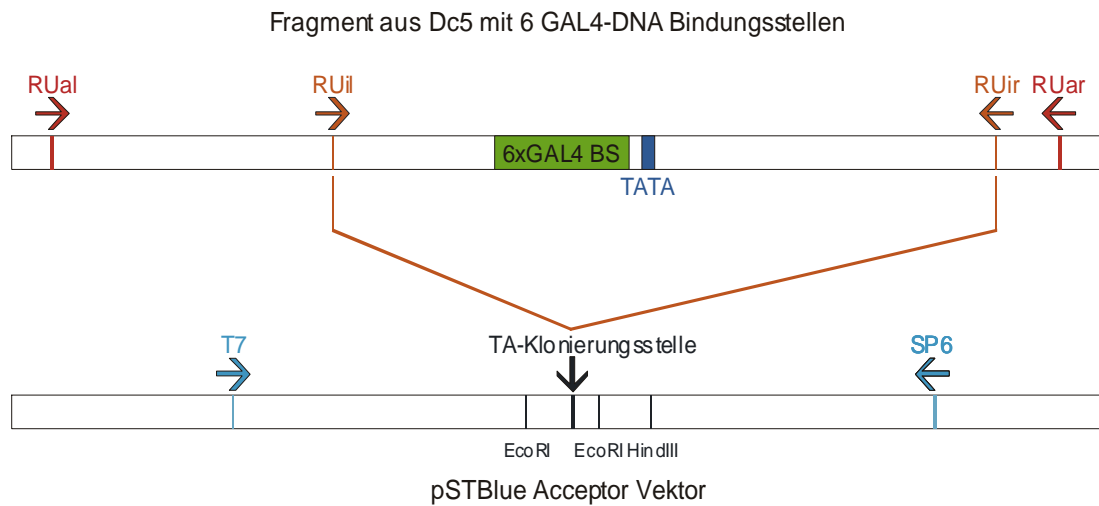
Abbildung 27: Reinduzierbarkeit der neuen Vektoren mit alternativen Promotoren im Vergleich zum Tk Promotor. Für jeden Vektor wurden bis zum Zeitpunkt 7d zwei parallele Versuchsansätze durchgeführt. Nach Probenahme wurde das Medium komplett ausgetauscht, und bei einem Ansatz eine Reinduktion durchgeführt. Erneute Überstandsproben wurden 19 Tage nach Erstinduktion entnommen.

6.3. Methylierung der GAL4UAS Zielsequenzen des GeneSwitch™-Proteins

6.3.1. Bisulfit-Sequenzierung

Eine dritte mögliche Erklärung der ausbleibenden Reinduzierbarkeit der Interleukin-Expression ergibt sich aus der notwendigen Bindung des GeneSwitch™-Transaktivatorproteins an die GAL4UAS Bindungsstellen. In diesem Zusammenhang ist in Pflanzen eine Inhibition der Bindung der GAL4-DNA-Bindungsdomäne an die GAL4UAS (vgl. Abb. 1) durch Methylierung der terminalen Cytosine beschrieben, welche essentiell für die Bindung scheinen (Gälweiler *et al.*, 2000; Marmorstein *et al.*, 1992). RASF Zellen wurden mit Vektor 5 infiziert (moi 5), wie gewohnt induziert und nach 7 bzw. 28 Tagen die Gesamt-DNA

präpariert. Anschließend erfolgte eine Bisulfitbehandlung von 5µg DNA wie in Kapitel 2.2.6 (S. 25) beschrieben. Mit 1µl der gereinigten bisulfitbehandelten DNA erfolgte dann eine Zweischritt-PCR zur spezifischen Amplifikation des jeweiligen DNA-Abschnittes. Aus dem rechtsterminalen Cosmid Dc5 wurde dieser so gewählt, daß er die sechs GAL4UAS Bindungsstellen und die adenovirale E1bTATA Box enthielt. Vor der Sequenzierung wurden 2µl des erhaltenen PCR-Fragments mittels Takara-Ligationskit mit 0,5µl pSTBlue *Acceptor* Vektor ligiert, und das Ligationsprodukt in *XL-1 Blue* Hitzeschock kompetente Bakterien kloniert. Positive Klone wurden mittels Blau-Weiß Selektion identifiziert. Nach Vermehrung und Präparation wurden die inserierten PCR-Fragmente mit Hilfe der Primer T7 und SP6, die außerhalb der TA-Klonierungsstelle im pST-Blue *Acceptor* Vektor angreifen, sequenziert (Abb. 28). Es wurden 25 verschiedene Klone in beiden Orientierungen analysiert. Bei 4 Klonen zeigte sich eine Methylierung (Abb. 28, mit Sternchen * gekennzeichnet), wobei nur eine davon an der terminalen, für die Bindung möglicherweise kritischen Stelle, auftrat. Diese und zwei weitere Methylierungen waren dem Zeitpunkt 28 Tage nach Induktion zuzuordnen, was der Erwartung entspricht, mit zunehmender Zeit mehr DNA-Modifikationen vorzufinden. Bemerkenswert ist, daß bei 4 Klonen auch eine T? C bzw. A? G Mutation (Abb. 28, mit Rauten # gekennzeichnet) auftrat, wobei es sich hierbei auch um Artefakte der PCR-Amplifikation handeln kann, verursacht durch Einbaufehler der DNA-Polymerase. Nur einer dieser Klone war dabei dem Zeitpunkt 28 Tage nach Erstinduktion zuzuordnen. Festzuhalten bleibt, daß zwar bei 8 von 25 Klonen DNA-Veränderungen festzustellen waren, jedoch nur in einem Fall eine Methylierung an der für die GAL4-Bindung möglicherweise kritischen Stelle auftrat. Eine Methylierung der GAL4UAS-Sequenzen scheint somit als Ursache der Inhibition der reinduzierbaren Interleukinexpression unwahrscheinlich.



```

GCCTCTGCAACTGTAGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGCGCCATTTCGCCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAA
CGGAGACGTTGACATCATTCTCTTTTATGGCGTAGTCGCGGTAAGCGGTAAAGTCCGACGCGTGTGACAACCTT

GGGCGATCGGTGCGGGCCTCTCTGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGA TGTGCTGCAAGGCATTAAGTTGG
CCCCTAGCCACGCGCCGAGAAGCGATAATGCGGTGACCGCTTCCCTACACGACGTTTCGCTAATTCAACC

GTAAAGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGCGCCAGTGAAATCGAGCTCGGTACCGGGGGCGC
CATTGCGGTCCCAAAGGGTCAGTGCTGCAACATTTGCTGCCGGTCACTTAAGCTCGAGCCATGGCCCCCGCG

GCCGATCCTTAATTAAGTCTAGAGTCGACTGTTTATTATTGAAGCAATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGATT
CGGCTAGGAATTAATTGAGATCTCAGCTGACAAATAATAACTTCGTAAATAGTCCCAATAACAGAGTACTCTAA

ATTGAAGCATTATCAGGGTTATGCTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAG
TAACCTCGTAAATAGTCCAAATAACAGAGTACTCGCTATGTATAACTTACATAAATCTTTTATTTGTTTATC

GGGTTCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTGACGGA TCGGAGATCGTACCGAGCTCTTACGCG
CCCAAGGCGCGTGTAAAGGGCTTTTACGGTGGACTGACGCTGCCTAGCCCTCATGATGGCTCGAGAATGCGC

GGTCGAAGCGGAGTACTGTCTCCGAGTGGAGTACTGTCTCCGAGCGGAGTACTGTCTCCGAGT CGAGGGTTCG
CCAGCTTCGCCTCATGACAGGAGGCTCACCTCATGACAGGAGGCTCGCTCATGACAGGAGGCTCAGCTCCGAGC

*      *      *      #
AAGCGGAGTACTGTCTCCGAGTGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCTCCGAGTCTAGAGGGT
TTGCTCATGACAGGAGGCTCACCTCATGACAGGAGGCTCGCTCATGACAGGAGGCTCAGCTGAGATCTCCCA

ATATAATGGATCTCGAGATATCGGAGCTCGTTTGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTT
TATATTAACCTAGAGCTCTATAGCTCGAGCAAATCACTTGGCAGTCTAGCGACCTCTGCGGTAGGTGCGACAAA

TGACCTCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAA CGGTGCATTGGAA CGGCATTCCCCG
ACTGGAGGTATCTTCTGTGGCCCTGGCTAGGTGCGAGGCGCGGCCCTTGCCACGTAACCTTGCGGTAAGGGGCG

TGTTAATTAACAGGTAAGTGTCTTCTCTGTTTCTTCCCCTGCTATTCTGCTCAACCTTCTATCAGAACTG
ACAAATTAATTGTCATTCA CAGAAGGAGGACAAA GGAAGGGGACGAT AAGACGAGTTGGAAGGATAGTCTTTGAC

CAGTATCTGTATTTTGTAGCAGTAATACTAACGGTTCTTTTTTCTCTTACAGGCCACCAAGCTTGGTACCG
GTCA TAGACATAAAAACGATCGT CATTATGATG CCAAGAAAAAAGAGAA GTGTCGGTGGTT CGAACCATGGC

AGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATTCGAAGGCATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTGCTGCTGCTCT
TCGAGCCTAGGTGATCAGGTCACACCACCTTAAGCTTCGTACGTGTGAGTCGTGACGAGACAACGGACCAGGA

CCTGACTGGGGTGAGGGCCAGCCAGGCCAGGGCACCCAGTCTGAGAACAGC
GGACTGACCCCACTCCCGGTCGGTCCGGTCCCGTGGGTCAGACTCTGTCTG
  
```

Abb. 28: Übersicht über Versuchsaufbau und Ergebnis der Bisulfit-Sequenzierung. DNA wurde 7 und 28 Tage nach Erstinduktion gewonnen und nach Bisulfitbehandlung eine Zweischnitt-PCR mit den Primerpaaren RUil und RUar (rot markierte Sequenz) bzw. RUil und RUir (orange markierte Sequenz) durchgeführt. Die bei der Sequenzierung gefundenen Methylierungen sind in der nicht-bisulfitkonvertierten Ursprungssequenz mit Sternchen (*), die gefundenen Mutationen mit Rauten (#) oberhalb der Sequenz dargestellt.

6.3.2. 5'-Azacytidin Behandlung

Eine weitere Möglichkeit, um DNA-Methylierung als Ursache des Abschaltens von Promotoren bzw. der Beeinflussung der GAL4UAS Einheiten durch Methylierung auszuschließen, ist die Behandlung mit Reagenzien wie 5'-Azacytidin (5'-AzaC). Hierzu wurden erneut HFF Zellen mit den induzierbaren Vektoren 5 (enthält den Tk Promotor) und 15 (enthält den PGK Promotor) infiziert, induziert, und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Erstinduktion Überstandsproben entnommen. Zu einem Teil der Proben wurde parallel zur Erstinduktion 5'-Azacytidin (5'-AzaC, 4µM Endkonzentration) zugegeben, ein Reagenz, welches DNA-Methylierung durch Blockade der zellulären Methyltransferase inhibiert (Christman *et al.*, 1983; Christman 2002). Eine Reinduktion erfolgte dann in einem Teil der Ansätze 13 Tage nach Erstinduktion. Auch hierbei erfolgte parallel ein Zusatz von 5'-AzaC. Überstandsproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und per ELISA analysiert (Abb. 29).

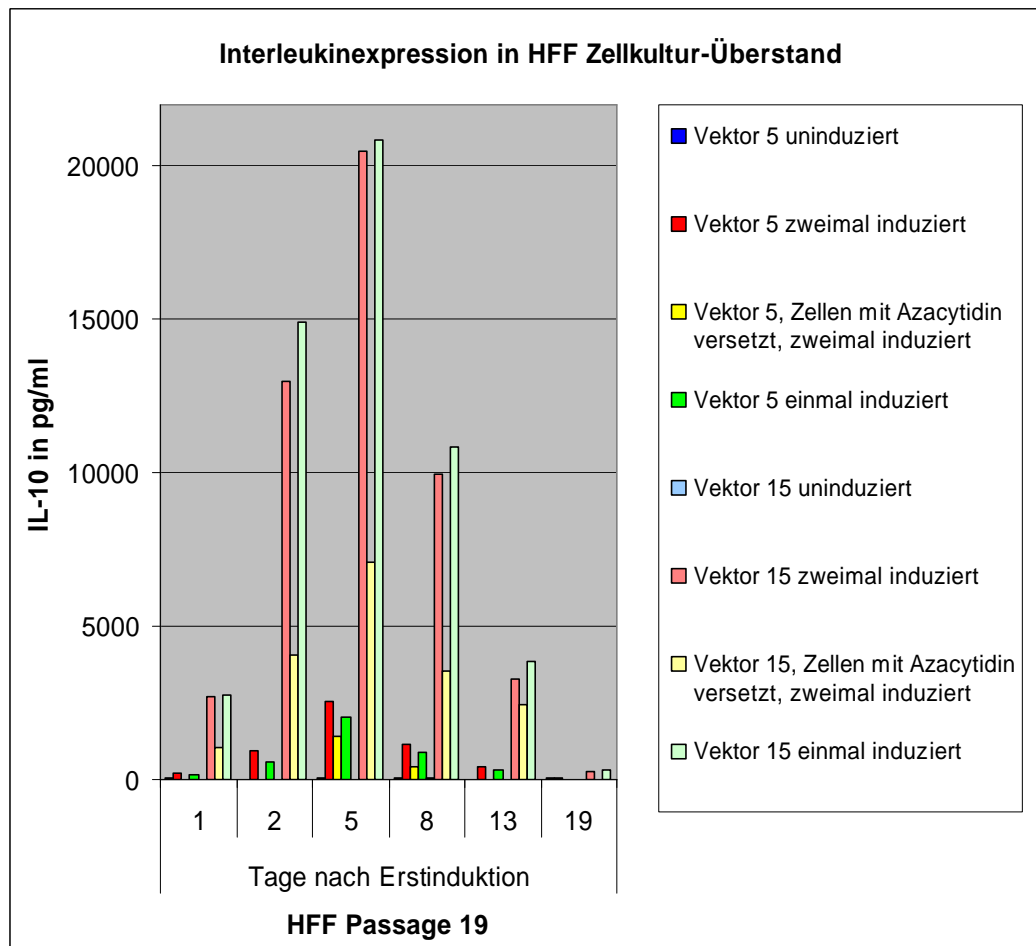


Abb. 29: Reinduktion nach 5'-Azacytidin Behandlung. HFF Zellen wurden mit Vektor 5 (Tk Promotor) und Vektor 15 (PGK Promotor) infiziert, induziert, und z.T. parallel mit 4µM 5'-Azacytidin versetzt. Reinduktion und gegebenenfalls erneuter 5'-Azacytidin Zusatz erfolgte 13 Tage nach Erstinduktion.

Mit keinem der beiden Vektoren, mit und ohne Zusatz von 5'-AzaC, erfolgte eine sekundäre oder reaktivierbare Reinduktion verglichen mit der einmaligen Induktion. Statt dessen führte der Zusatz von 5'-AzaC in beiden Vektoren zu einer geringeren Interleukinexpression, was durch eine möglicherweise verringerte Proteinsynthese erklärt werden kann. Obwohl die Zellen während des Untersuchungszeitraums keinerlei morphologische Veränderungen zeigten, schließt dies toxische Effekte des 5'-AzaC nicht aus. Insgesamt scheint eine Inhibition der Expression infolge Methylierung als Ursache für die ausbleibende sekundäre Induktion eher unwahrscheinlich zu sein. Anzumerken ist auch, daß der PGK-Promotor Vektor (Vektor 15) wiederum eine gesteigerte Expressionsrate im Vergleich zum Tk-Promotor Vektor (Vektor 5) aufwies.

7. In vitro Funktion der Vektoren

7.1. Reduktion der IL-1 β stimulierten MMP-3 Expression

Matrixmetalloproteinasen, wie z.B. Kollagenase-1 (MMP-1) und Stromelysin-1 (MMP-3), sind im physiologischen Zustand an Reparatur- und Umbauprozessen des Knorpels beteiligt. Bei der RA übernehmen sie jedoch die zentrale Rolle bei der Destruktion des Knorpels (Feldmann *et al.*, 1996; Gay *et al.*, 1993). Um die Funktion der hergestellten Vektoren *in vitro* nachzuweisen, wurden RASF Zellen mit Vektor 5, konstitutivem Vektor oder Kontrollvektor mit einer *moi* von 5 infiziert, nach 24h induziert und nach weiteren 48h mit 0,1ng/ml IL-1 β stimuliert. Überstandsproben wurden 6 Tage nach Induktion entnommen und per SDS-PAGE aufgetrennt. Die MMP-3 Bildung wurde im Anschluß mit einem monoklonalen MMP-3 Antikörper detektiert (Abb. 30).

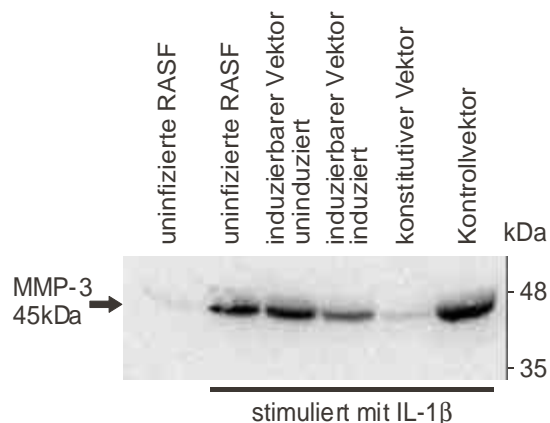


Abb. 30: IL-1 β stimulierte MMP-3 Expression in RASF Zellen. Die Zellen wurden mit induzierbarem Vektor 5, konstitutivem Vektor oder Kontrollvektor mit einer *moi* von 5 infiziert. Gleiche Mengen an Überstandsproben wurden aufgetrennt, die Proteine auf eine Immobilon Membran transferiert, und ein Western Blot zur Detektion von MMP-3 durchgeführt.

IL-1 β behandelte RASF Zellen wiesen, wie erwartet, im Vergleich zu nicht-stimulierten RASF Zellen eine wesentlich höhere MMP-3 Expression auf. Induzierbarer Vektor im uninduzierten Zustand bewirkte keine Reduktion der zellulären MMP-3 Produktion im Vergleich zu uninfizierten oder mit Kontrollvektor infizierten RASF Zellen. Im induzierten Zustand – also unter Bildung von IL-1RA und IL-10 – wurde die Aktivierung der MMP-3 Expression durch IL-1 β jedoch deutlich inhibiert. Im Fall des konstitutiven Vektors erreichte die MMP-3 Bildung

sogar annähernd das Niveau nicht-stimulierter Zellen, was sich durch die erwähnte raschere Interleukinexpression des konstitutiven Expressionssystems erklären läßt (Abb. 16). Dies macht die biologische Funktionsfähigkeit der beiden Vektorsysteme deutlich und zeigt deren therapeutisches Potential.

7.2. Einfluß der Vektoren auf die Expression verschiedener Zytokine

Die Infektion der Zellen durch den HVS-Vektor sowie die vektorbedingte Interleukinexpression kann die Expression verschiedenster Chemokine und Interleukine beeinflussen. Eine qualitative Abschätzung dieses Einflusses erlaubt ein membrangebundenes, einem Western Blot ähnliches Analyseverfahren, zur gleichzeitigen Detektion 79 verschiedener Zytokine (*Human Cytokine Array V*, RayBiotech, Norcross, USA). Hierzu wurden RASF Zellen mit Vektor 5 bzw. Kontrollvektor infiziert, induziert, und 7 Tage nach Induktion Überstandsproben entnommen und in diesem Zytokinassay getestet (Abb. 31; Übersichtstabelle der auf der Membran vorhandenen Zytokine im Anhang).

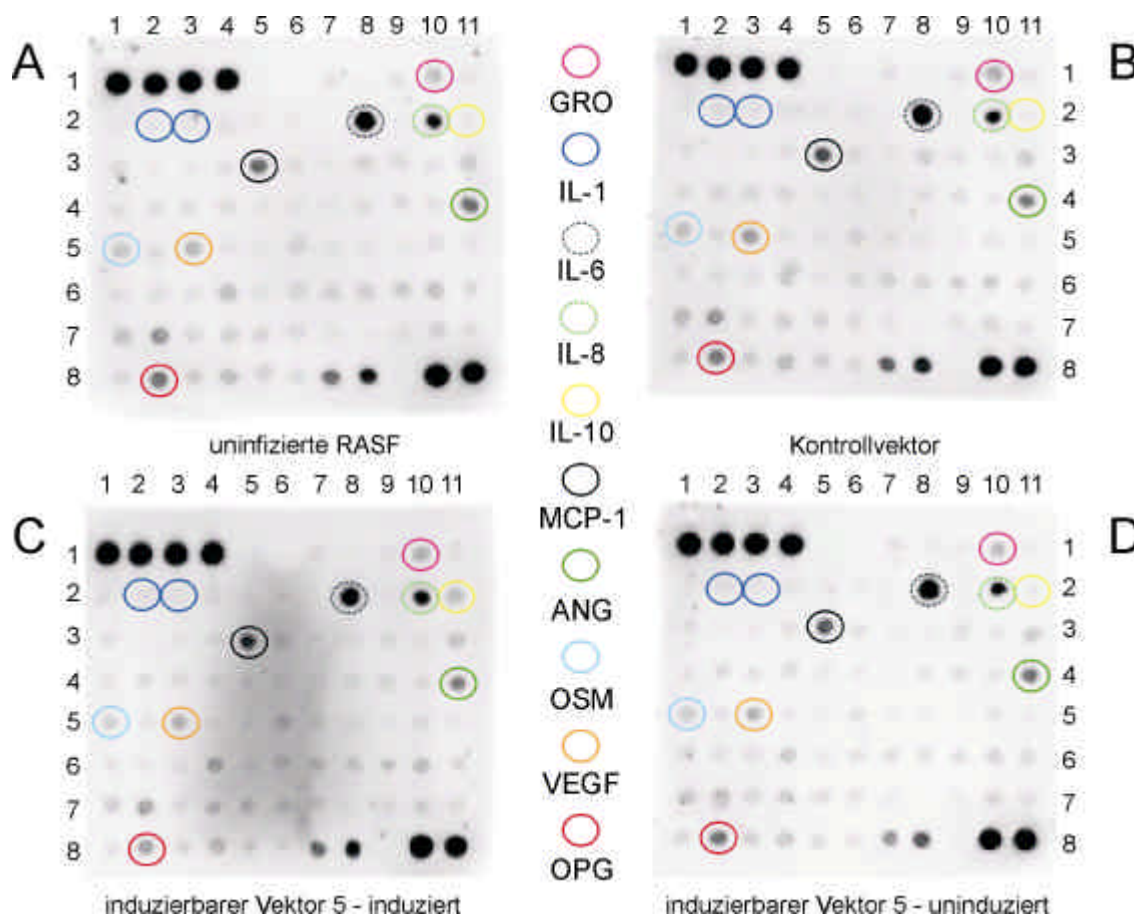


Abb. 31: Einfluß des Vektors auf die Expression verschiedener Zytokine. RASF Zellen der Passage 8 wurden mit induzierbarem Vektor 5 (C, D) oder Kontrollvektor (B) mit einer moi von 5 infiziert, gegebenenfalls induziert, und 7 Tage nach Induktion Überstandsproben entnommen und getestet. Als Negativkontrolle diente der Überstand uninferierter Zellen (A). Farbig hervorgehoben sind einige besonders interessante Zytokine für die eine mögliche Regulation infolge der vektorbedingten Interleukinexpression denkbar ist. IL-10 = Interleukin 10, ANG = Angiogenin, OPG = Osteoprotegerin, OSM = Oncostatin M, VEGF = Vascular endothelial growth factor, MCP-1 = Monocyte chemoattractant protein 1 und GRO = Growth regulated oncogene.

Interleukin 10 (gelber Kreis) fungierte hierbei als Positivkontrolle einer erfolgreichen Infektion und Induktion und war nur im Falle des induzierten Vektors 5 detektierbar. Einige Zytokine (z.B. MCP-1 und Oncostatin M; siehe auch Auflistung im Anhang), für die eine Interaktion mit dem Krankheitsbild der RA bzw. eine Regulation durch die anti-inflammatorischen Interleukine IL-1RA und IL-10 beschrieben ist, zeigten eine deutliche Expression. Es war jedoch mit dieser Untersuchungsmethode kein quantitativer Unterschied zwischen den Ansätzen feststellbar.

7.3. Zelluläre ICAM-1 und THY-1 Expression

Das Umfeld der Synoviozyten im Zustand der RA ist reich an pro-inflammatorischen Zytokinen. Die Pathogenese der RA ist gekennzeichnet durch gesteigerte Zellproliferation, Migration von Entzündungszellen und Produktion von knorpeldegradierenden Enzymen. Das Zytokin-Ungleichgewicht der RA soll eine durch IL-1 β und TNF α gesteigerte Expression von Integrinen wie ICAM-1 (CD54) auf der Zelloberfläche von Synoviozyten bewirken, die mit der gesteigerten Einwanderung von Entzündungszellen in das Synovium einhergeht (Lindsley *et al.*, 1993). Es wurde daher untersucht, ob die exprimierten anti-inflammatorischen Zytokine,

die ICAM-1 Expression beeinflussen, und damit eventuell positive therapeutische Effekte ausgelöst werden. RASF Zellen wurden mit konstitutivem, induzierbarem oder Kontrollvektor infiziert, gegebenenfalls induziert, und die ICAM-1 Expression 7 Tage nach Infektion durchflußzytometrisch bestimmt. Die Expression von THY-1 (CD90) diene als Marker für Synoviozyten (Abb. 32). Unabhängig von Infektion und Vektor war kein Einfluß auf die ICAM-1 Expression feststellbar.

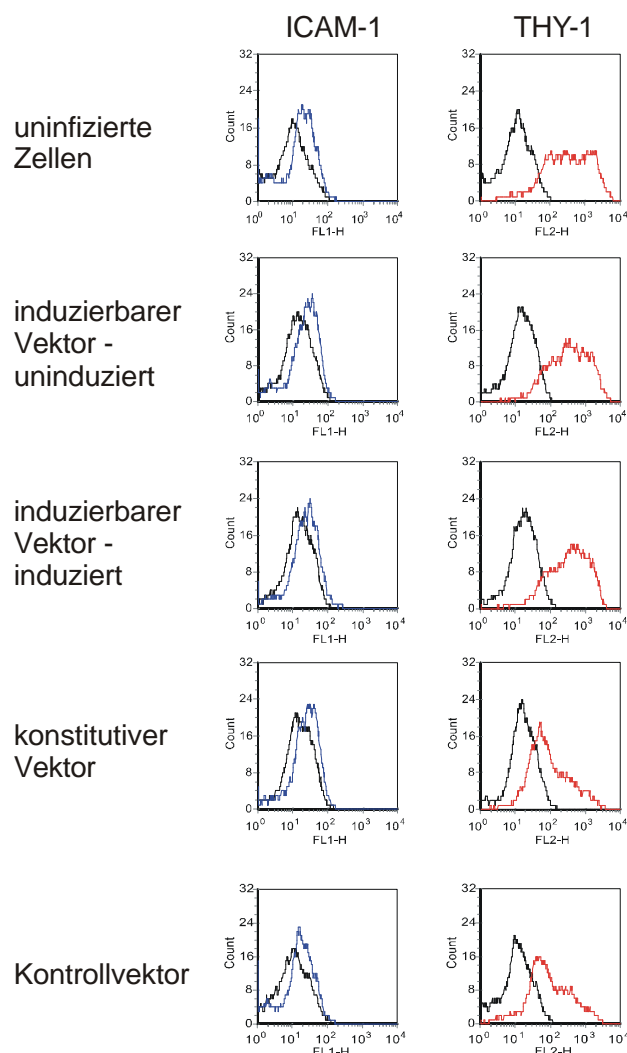


Abb. 32: Einfluß der Infektion und der Expression anti-inflammatorischer Zytokine auf die ICAM-1 Expression. RASF Zellen wurden mit induzierbarem, konstitutivem oder Kontrollvektor mit einer moi von 5 infiziert und induziert. 7 Tage nach Infektion wurde die ICAM-1 (links, blau) und THY-1 Expression (rechts, rot) durchflußzytometrisch bestimmt. Uninfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Die schwarzen Kurven stellen jeweils die Isotypkontrolle dar.

V. Diskussion

Das gezielte Einbringen fremder oder zusätzlicher genetischer Information in eukaryote Zellen kann durch eine Reihe unterschiedlicher Methoden erfolgen, wobei man diese nach dem Vehikel des Gentransfers prinzipiell in zwei Gruppen unterteilen kann, nämlich in virale und nicht-virale Verfahren. Virale Vektoren stellen, insbesondere *in vivo*, die effektivere Methode des Gentransports dar, was sich in ihrer häufigeren Verwendung im Rahmen gentherapeutischer klinischer Studien widerspiegelt (John Wiley & Sons 2004). Dabei wird vor allem ihr Einsatz gegen konventionell nicht, bzw. schwer behandelbare Erkrankungen, wie Krebs, HIV-Infektion, kardiovaskuläre Krankheiten, aber auch die rheumatoide Arthritis erforscht (Cichutek 2004).

Wesentliche Kriterien eines idealen Vektors sind eine einfache und reproduzierbare Herstellung, das Erreichen einer hohen Vektorkonzentration, die Fähigkeit in einen spezifischen Locus zu integrieren oder episomal stabil zu persistieren und das Vermeiden einer Immunantwort infolge der Verabreichung. All diese Punkte werden derzeit noch von keinem Vektor in vollem Umfang erfüllt (Verma und Somia 1997). Auch die hier verwendeten *Herpesvirus saimiri* basierenden Vektoren können diesen hohen Anforderungen derzeit nicht Genüge leisten. Jedoch besitzen sie einige Eigenschaften, wie die Infizierbarkeit eines breiten Zellspektrums (Simmer *et al.*, 1991), eine hohe Klonierungskapazität und die episomale Persistenz (Grassmann und Fleckenstein 1989), die in zahlreichen Studien belegt wurden (Frolova-Jones *et al.*, 2000; Stevenson *et al.*, 1999; Stevenson *et al.*, 2000b; Stevenson *et al.*, 2000a). Die Darstellung rekombinanter HVS Vektoren mittels homologer Rekombination aus fünf überlappenden Cosmiden, und die damit verbundene schnellere Modifizierbarkeit der HVS-Vektoren gewährleisten eine einfache und reproduzierbare Herstellung. Hervorzuheben ist hier, daß bei dieser Herstellungsweise der Vektoren eine Wildtypvirus-Kontamination, die bei anderen Herstellungsmethoden oftmals problematisch ist, von vornherein ausgeschlossen ist. Die hohe Klonierungskapazität resultiert aus der Entfernung von repetitiver, und damit redundant vorhandener, terminaler H-DNA und aus der Deletion von für die Replikation nicht erforderlichen Leserahmen. Dies erlaubt die gleichzeitige Integration mehrerer therapeutischer Gene bzw. die parallele Integration eines regulierbaren Expressionssystems, welche für viele gentherapeutische Zielsetzungen vorteilhaft ist. Ein Beispiel eines induzierbaren Expressionssystems ist das GeneSwitch™-System, dessen Funktionsfähigkeit bisher in adenoviralen und auf *Herpesvirus simplex* basierenden Vektoren unter Beweis gestellt wurde (Burcin *et al.*, 1999; Oligino *et al.*, 1998). Verschiedene HVS Vektoren wurden nach Modifikationen der links- und rechtsternalen Cosmide hergestellt. In allen wurde ein korrekt verlaufener homologer Rekombinationsprozeß (Abb. 7), sowie eine korrekte Insertion der Transgenkassetten (Abb. 8), und eine nach Induktion mit Mifepriston aktivierbare Transgenexpression (Abb. 9)

gezeigt. Dabei waren die basalen Interleukin-Expressionswerte des induzierbaren Systems in OMK, HFF und RASF Zellen im nicht aktivierten Zustand meist so niedrig, daß sie mit der empfindlichen Methode des Sandwich-ELISAs nicht detektierbar, bzw. von Leerwerten nicht unterscheidbar waren. Die Funktionsfähigkeit der positiven Rückkopplungsschleife, die zu einer verstärkten Bildung des GeneSwitch™-Proteins nach Aktivierung durch Mifepriston führt (Abb. 1), konnte in OMK und HFF Zellen mittels Western Blot dargestellt werden (Abb. 10 und 14).

Eine fundamentale Bedingung für regulierbare Expressionssysteme stellt vor allem die Notwendigkeit einer selektiven und sensitiven Aktivierung durch die Induktionssubstanz dar. Zur Charakterisierung dieser Parameter im Kontext von *Herpesvirus saimiri* wurden Untersuchungen in OMK Zellen und humanen Fibroblasten durchgeführt. Dabei war eine unselektive Aktivierung des GeneSwitch™-Systems, das auf einem C-terminal verkürzten Progesteronrezeptor beruht, durch den ursprünglichen Liganden Progesteron bei einer Konzentration von 1,5µM nicht meßbar (Abb. 11). Maximale physiologische Progesteron-Serumspiegel werden beim Menschen im dritten Trimenon der Schwangerschaft erreicht und liegen zwischen 15-20µg/l, was etwa einer Serumkonzentration von 0,07µM entspricht. In der Postmenopause bzw. beim Mann werden lediglich Serumspiegel kleiner 1µg/l (4nM) gemessen. Eine unselektive Aktivierung bei Konzentrationen von 1,5µM, entsprechend dem mind. 20-375-fachen der physiologischen Normalwerte, konnte nicht beobachtet werden. Unerwünschte Interaktionen *in vivo* sind infolgedessen nicht zu erwarten. Im Gegensatz dazu war eine Mifepriston-Konzentration von 100pM ausreichend, um eine etwa 70%ige Aktivierung des induzierbaren Expressionssystems auszulösen (Abb. 12). Dies entspricht einer mehr als 1000-fach geringeren Dosis als für Progesteron-antagonistische Effekte erforderlich wäre (Sarkar 2002), und korreliert gut mit ursprünglichen Studien zum plasmid-basierten System (Bartsch *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1994). Auch liegt dieser Wert unter der Dosis, die bei Untersuchungen des GeneSwitch™ im adenoviralen, *Herpes simplex*-viralen oder lentiviralen Kontext festgestellt wurde (Oligino *et al.*, 1998; Sirin und Park 2003; Xu *et al.*, 2003). Kritisch anzumerken ist eine mögliche Interaktion auch geringer Mifepristonmengen im Zusammenhang mit einer bestehenden Glucocorticoidtherapie im Rahmen der rheumatoiden Arthritis. In diesem Kontext kann eine totale Blockade der Wirkung von Dexamethason *in vitro* durch eine Mifepristonkonzentration von 100nM beobachtet werden (DiBattista *et al.*, 1991). Inwieweit diese Beobachtung auf die *in vivo* Situation übertragen werden kann, und ob sie unter den Umständen einer Therapie der rheumatoiden Arthritis mittels viraler Vektoren eine Rolle spielen könnte, muß vor einem möglichen Einsatz des Systems geklärt werden, steht aber nicht im Fokus dieser Arbeit.

Die kombinierte Expression der anti-inflammatorischen Interleukine – IL-1RA und IL-10 – bewirkt in Tiermodellen zum Krankheitsbild der RA sowohl eine Inhibition der

Knorpeldegradation, als auch der Knorpelinvasion (Müller-Ladner *et al.*, 1997; Müller-Ladner *et al.*, 1999). Untersuchungen in humanen Vorhautfibroblasten (HFF) und synovialen Fibroblasten (RASf) zeigten eine von der Vektordosis abhängige Transgenproduktion, welche nach einigen Tagen ihr Maximum erreichte und danach kontinuierlich absank (Abb. 13, 16 und 17). Dies korreliert mit Versuchen mit adenoviralen Vektoren, bei denen nach einmaliger Mifepristonapplikation nach 24h das Expressionsmaximum erreicht wurde, und die Expression dann im Verlauf von 168h auf das Basisniveau zurückging (Burcin *et al.*, 1999). In Synoviozyten zeigte sich dabei ein deutlicher Einfluß zellulärer Parameter, wie Herkunft und Passagenzahl (Abb. 17), während dies bei HFF Zellen eine eher untergeordnetere Rolle spielte (Abb. 19). Dies korreliert mit Beobachtungen der Arbeitsgruppe Müller-Ladner mit adenoviralen Vektoren (persönliche Kommunikation Frau Dr. E. Neumann, Klinikum der Universität Regensburg).

In Langzeitexpressionsstudien in HFF und RASf Zellen wurden nach 5-10 Tagen maximale Expressionsspiegel zwischen 5 und 7ng/ml erzielt, wobei das induzierbare System höhere Werte lieferte (vgl. auch Abb. 17). In Synoviozyten war bis zum Zeitpunkt 35 Tage nach Erstinduktion noch eine Interleukinexpression = 500pg/ml detektierbar. Eine mehrfache Aktivierung bzw. Reinduktion des Expressionssystems war in beiden Zelltypen nicht möglich (Abb. 18 und 19), wobei eine Reinduzierbarkeit des Systems bisher nur in Studien *in vivo* gezeigt wurde (Burcin *et al.*, 1999; Draghia-Akli *et al.*, 2002). Untersuchungen auf RNA-Ebene korrelieren mit den Daten auf Proteinebene und zeigen eine im Zeitverlauf abnehmende mRNA Bildung für alle untersuchten Fremdgene (Abb. 18). Hierbei muß jedoch ein Verdünnungseffekt infolge einer durchschnittlichen Infektionsrate zwischen 70-80% und der Zellvermehrung berücksichtigt werden. Diese Beobachtungen auf mRNA Ebene korrelieren auch mit der Transaktivator-Proteinbildung im Western Blot (Abb. 22). Hier war nach Reinduktion zwar noch GeneSwitch™-Protein detektierbar, jedoch konnte die gesteigerte Bildung infolge der positiven Rückkopplung nicht mehr festgestellt werden. Ursächlich für dieses Phänomen könnte ein Verlust der Vektorkopien im Zeitverlauf sein. Zur Klärung dieser Frage wurden Experimente zur Persistenz der HVS-Vektoren durchgeführt. Diese konnten eine Abnahme der Vektorkopienzahl im Zeitverlauf bestätigen, zeigen jedoch nach 28 Tagen eine durchschnittliche Vektorkopienzahl zwischen drei und vier pro Zelle (Abb. 23). Dieses Ergebnis korreliert wiederum mit dem positiven *orf57* Nachweis in der RT-PCR 28 Tage nach Infektion (Abb. 18). Dennoch ist dieser Wert im Vergleich zu der Persistenz von HVS in T-Lymphozyten, in denen eine hohe episomale Kopienzahl (30-100) über mehrere Monate beobachtet werden kann, als eher gering anzusehen. Dies läßt den Rückgang der Kopienzahl als Mitursache der fehlenden sekundär induzierten Interleukinexpression vermuten. Anzumerken ist hierbei aber, daß auch die Kopienzahl in T-Zellen schwanken kann (Fickenscher *et al.*, 1996), und unklar ist, ob die Ergebnisse aus

T-Zellen auf humane Fibroblasten übertragen werden können. Weitere Faktoren, wie ein möglicher Wachstumsnachteil infizierter gegenüber uninfizierten Fibroblasten, und ein damit verbundener verstärkter Verdünnungseffekt im Zeitverlauf, könnten ebenfalls zu der Problematik beitragen. Es bleibt jedoch festzustellen, daß die vorhandene Vektorkopienzahl pro Zelle auch nach dieser Zeitspanne zu einer ausreichenden und im ELISA detektierbaren Interleukinexpression führen sollte, und die Reduktion der episomalen Vektorkopien das totale Ausbleiben der Expression nach Reinduktion allein nicht erklären kann.

Abbildung 1 (s. Einleitung) verdeutlicht zwei weitere Möglichkeiten, wie durch Inhibition des Expressionssystems nach versuchter Reinduktion die ausbleibende gesteigerte GeneSwitch™- und Interleukinexpression erklärt werden könnte. Verantwortlich könnte einerseits eine Herunterregulation des für die GeneSwitch™-Protein Expression verantwortlichen *Herpes simplex* viralen Thymidinkinase-Promotors, und zum anderen eine fehlende Bindung des Transaktivatorproteins an die GAL4UAS-Sequenzen sein. Im Falle des *Herpesvirus simplex* Thymidinkinase-Promotors ist eine zeitabhängige Deaktivierung durch Methylierung beschrieben (Kass *et al.*, 1997). Zur Klärung der Frage, ob eine Methylierung des Promotors auch hier stattfindet, wurde ein Austausch dieses Promotors durch konstitutiv aktive, methylierungsstabilere Promotoren von zellulären Haushaltsgenen bzw. durch den CpG armen Promotor des *orf14* Leserahmens von *Herpesvirus saimiri* durchgeführt. Auch mit den derart modifizierten Vektoren konnte jedoch in humanen Fibroblasten kein signifikanter Unterschied im Reinduktionsverhalten beobachtet werden (Abb. 27). Dies läßt eine Promotormethylierung als Ursache der verminderten GeneSwitch™-Proteinbildung, und damit der ausbleibenden sekundär induzierten Interleukinexpression, als unwahrscheinlich erscheinen. Eine Methylierung von GAL4UAS Sequenzen wurde bisher nur in Pflanzen beschrieben, wobei als die, für die Bindung der GAL4-DNA-bindenden Domäne kritischen Stellen, die terminalen Cytosine in der Aktivierungssequenz beschrieben sind. Eine Methylierung dieser Cytosine führt zur Inhibition der Bindungsfähigkeit des Transaktivatorproteins und folglich zum Ausbleiben der Aktivierung der Interleukinexpression (Gälweiler *et al.*, 2000). Zum Ausschluß dieser Problematik wurde eine Behandlung der Zellen mit 5'-Azacytidin, einem Inhibitor von Methyltransferasen, der Methylierungsreaktionen blockiert bzw. rückgängig macht, sowie im Zeitverlauf eine Bisulfitsequenzierung mit der DNA infizierter und induzierter Synoviozyten durchgeführt. Grundlage der Bisulfitsequenzierung ist eine Konversion aller nicht-methylierter Cytosine zu Uracil, woraus nach einer PCR Amplifikation Thymidine resultieren. Methylierte Cytosine bleiben bei dieser Konversion erhalten und werden bei einer nachfolgenden Sequenzierung der behandelten DNA auch entsprechend detektiert. Die Sequenzierung von 25 verschiedenen Klonen jeweils in beiden Orientierungen zeigte bei nur 4 Klonen eine Methylierung (Abb. 28, Sternchen), wobei sich nur eine davon an der terminalen, für die

Bindung kritischen Stelle fand. Bei 4 Klonen konnte eine vermutlich unerhebliche T? C bzw. A? G Mutation (Abb. 26, Rauten) festgestellt werden, wobei hierfür sehr wohl auch Einbaufehler der DNA-Polymerase während der PCR-Amplifikation verantwortlich sein könnten. Eine Behandlung der Zellen mit 5'-Azacytidin zur Promoter-Demethylierung zeigte keinen Einfluß auf die sekundär induzierte Interleukinexpression (Abb. 29). Somit erscheint eine Methylierung der Promotoren inklusive der GAL4UAS Sequenzen als Ursache der Inhibition der reinduzierbaren Interleukinexpression unwahrscheinlich. Die Ursache der nach Reinduktion verringerten GeneSwitch™-Proteinbildung und der ausbleibenden Interleukinexpression kann somit eine allgemein verringerte Expression der eingeführten Fremdgene durch zelluläre Regulationsmechanismen sein. Eine Kombination aller dargestellten Effekte mit additiver oder sogar potenzierender Wirkung ist ebenfalls denkbar. Die Expression von MMP-3 und anderen Matrixmetalloproteinasen im Gelenk der rheumatoiden Arthritis wird durch pro-inflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-1 β und TNF α , die die Hauptmediatoren des Entzündungsgeschehens darstellen, aktiviert. Matrixmetalloproteinasen führen nachfolgend zur Degradation des Knorpels (Feldmann *et al.*, 1996; Gay *et al.*, 1993). Um die biologische Funktion der exprimierten Interleukine zu zeigen, wurden Synoviozyten mit induzierbaren bzw. konstitutiven HVS Vektoren infiziert, induziert und mit IL-1 β aktiviert. Die Aktivierung der MMP-3 Expression wurde mittels Western Blot dargestellt. Dabei konnte eine Inhibition der IL-1 β Aktivierung infolge des IL-1RA bzw. IL-10 Gentransfers gezeigt, und damit die biologische Funktion der Vektoren *in vitro* veranschaulicht werden (Abb. 30).

Des Weiteren wurde die Auswirkung der Expression der anti-inflammatorischen Zytokine auf die ICAM-1 Expression in RASF Zellen durchflußzytometrisch analysiert (Abb. 32). Die ICAM-1 Expression wird durch IL-1 β und TNF α gesteigert und spielt im Kontext der RA bei der gesteigerten Einwanderung von Entzündungszellen in das Synovium eine Rolle (Lindsley *et al.*, 1993). Hierbei konnte durch eine Expression der Transgene, verglichen mit Kontrollvektor infizierten und unbehandelten Zellen, jedoch keinerlei Einfluß auf die ICAM-1 Expression festgestellt werden.

Schließlich wurde die Auswirkung der exprimierten Interleukine auf die Expression 79 verschiedener Zytokine in einem qualitativen, membrangebundenen Detektionsverfahren untersucht (Abb. 31). Obwohl quantitative Aussagen zur Veränderungen der Expression durch diese Untersuchungsmethode nicht möglich waren, konnten einige interessante Kandidaten, wie zum Beispiel MCP-1 oder Oncostatin M, identifiziert werden, für die eine Interaktion mit dem Krankheitsgeschehen der rheumatoiden Arthritis und/oder eine Regulation durch IL-10 bzw. IL-1RA beschrieben ist (siehe Abb. 31 und Anhang). Dieser Arbeit nachfolgende Studien, im Rahmen erster präklinischer Tests der Vektoren im SCID-Mausmodell der RA, könnten in diesem Zusammenhang weitere Aufschlüsse liefern.

In der hier vorgestellten Arbeit konnten neuartige *Herpesvirus saimiri* Vektoren hergestellt werden, welche ein induzierbares Expressionssystem beinhalten. Die Infizierbarkeit von RASF Zellen, sowie die Funktionalität des Expressionssystems bei hoher Selektivität und Sensitivität, wurden im viralen Kontext charakterisiert. Zudem wurden verschiedene Mechanismen für das beobachtete Ausbleiben der sekundären Reaktivierung des konditionalen Expressionssystems untersucht. Die daraus resultierenden Daten lieferten jedoch keine endgültige Erklärung des Phänomens. Ebenfalls denkbar erscheint eine Kombination aller dargestellten Effekte mit additiver oder sogar potenzierender Wirkung. Schließlich konnte die biologische Funktionsfähigkeit der exprimierten anti-inflammatorischen Interleukine verdeutlicht werden. Die beschriebenen Versuche bilden somit eine Basis für erste präklinische Studien mit den beiden Vektortypen im SCID Mausmodell der rheumatoiden Arthritis.

VI. Zusammenfassung

Auf *Herpesvirus saimiri* basierende Vektoren für die Gentherapie können eine Alternative zu etablierten Vektoren darstellen, insbesondere aufgrund ihrer hohen Klonierungskapazität, der Infizierbarkeit verschiedenster Zelltypen und ihrer Fähigkeit zur episomalen Persistenz. Viele Erkrankungen erfordern eine steuerbare Expression eingebrachter Gene, wobei sich der Einsatz regulierbarer eukaryoter Expressionssysteme als hilfreich erwies. Um dies auch mit HVS-Vektoren zu ermöglichen, wurde zunächst das regulatorische GeneSwitch™-System zusammen mit anti-inflammatorischen Interleukinen in das virale Genom integriert. Attenuierte Vektoren wurden mittels homologer Rekombination hergestellt, verifiziert in Bezug auf korrekte Insertion und Rekombination, und die Selektivität und Sensitivität des induzierbaren Systems im viralen Kontext untersucht. Es zeigte sich, daß eine unselektive Aktivierung des GeneSwitch™-Systems durch dessen ursprünglichen Liganden Progesteron bei physiologischen Werten nicht beobachtet werden kann, und unerwünschte Interaktionen *in vivo* nicht zu erwarten sind. Eine Aktivierung des induzierbaren Systems gelang mit einer um mehr als 1000-fach geringere Mifepristondosis als für Progesteron-antagonistische Effekte erforderlich wäre. Bei Expressionsuntersuchungen in humanen Fibroblasten war eine von der Vektordosis abhängige Transgenproduktion beobachtbar, welche nach einigen Tagen ihr Maximum erreichte und danach kontinuierlich absank. In primären Synoviozyten zeigte sich eine langanhaltende Interleukinexpression, sowie ein deutlicher Einfluß zellulärer Parameter. Eine mehrfache Aktivierung des Expressionssystems war in beiden Zelltypen nicht möglich. Untersuchungen zum Transaktivatorprotein auf RNA- und Proteinebene korrelierten mit diesen Daten, und zeigten eine im Zeitverlauf abnehmende Bildung bzw. ausbleibende sekundäre Aktivierung. Mögliche Ursachen wie ein Verlust der episomalen Vektorkopien, eine Methylierung des für die Expression des Transaktivators verantwortlichen Promotors, oder der spezifischen Transaktivatorprotein-Bindestellen wurden untersucht. Es fand sich eine gewisse Reduktion der Vektorkopien im Zeitverlauf, während DNA-Methylierungsprozesse als Ursache ausgeschlossen werden konnten. Denkbar erscheint auch eine verringerte Expression der eingeführten Fremdgene durch allgemeine zelluläre Regulationsmechanismen, oder eine Kombination aller dargestellten Effekte mit additiver oder potenzierender Wirkung. Die biologische Funktion der exprimierten Interleukine wurde anhand der Blockade der IL-1 β aktivierten MMP-3 Expression in RASF Zellen veranschaulicht. Die Daten bilden eine Basis für erste präklinische Studien im SCID-Mausmodell der rheumatoiden Arthritis.

VII. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
CCR5	CC-Chemokin Rezeptor 5
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
COX	Cyclooxygenase
CPE	Cytopathischer Effekt
Cy3	Indocarbocyanin
d	Tage
DBD	DNA-Bindedomäne
DMARD	<i>Disease modifying anti-rheumatic drug</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescence protein</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immuosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FKS	Fötales Kälberserum
h	Stunde
HFF	<i>Human foreskin fibroblasts</i> , humane Vorhautfibroblasten
HVS	<i>Herpesvirus saimiri</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KSHV	Kaposi-sarcoma-Herpesvirus
MCP	<i>Major capsid protein</i>
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinase
moi	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
OMK	<i>Owl monkey kidney cells</i> , Nachtaffen-Nieren-Zellen
orf	<i>Open reading frame</i> , offener Leserahmen

Abkürzungen

PBS ₀	Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Magnesiumchlorid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGK	Phosphoglycerat-Kinase
PFA	Paraformaldehyd
RA	Rheumatoide Arthritis
RASF	<i>Rheumatoid arthritis synovial fibroblast-like cell</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RU486	Mifepriston
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
StpC	<i>Saimiri transformation-associated protein of subgroup C</i>
Tab.	Tabelle
TCIP	<i>Tissue culture infectious particles</i>
Tip	<i>Tyrosine-kinase interacting protein</i>
Tk	Thymidinkinase-Promotor von <i>Herpesvirus simplex</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
v	viral

VIII. Referenzen

American College of Rheumatology, 2002. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. *Arthritis Rheum.* 46, 328-346.

Arend, W.P., 2001. Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin-1 receptor antagonist. *Semin Arthritis Rheum.* 30, 1-6.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 2003. Current protocols in molecular biology. Current protocols, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Bartsch, J.W., Jackel, M., Perz, A., Jockusch, H., 2000. Steroid RU 486 inducible myogenesis by 10T1/2 fibroblastic mouse cells. *FEBS Lett.* 467, 123-127.

Biesinger, B., Fleckenstein, B., 1992. Transforming genes of T-lymphotropic herpesviruses. In: Dörfler, W., Böhm, P. (Eds.), *Molecular mechanisms in the malignant transformation by DNA viruses*. Verlag Chemie, Weinheim, New York, pp. 207-229.

Biesinger, B., Tsygankov, A.Y., Fickenscher, H., Emmrich, F., Fleckenstein, B., Bolen, J.B., Bröker, B.M., 1995. The product of the herpesvirus saimiri open reading frame 1 (tip) interacts with T cell-specific kinase p56lck in transformed cells. *J. Biol. Chem.* 270, 4729-4734.

Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.

Burcin, M.M., BW, O.M., Tsai, S.Y., 1998. A regulatory system for target gene expression. *Front Biosci.* 3, c1-c7.

Burcin, M.M., Schiedner, G., Kochanek, S., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W., 1999. Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 355-360.

Burkhardt, H., Möller, B., 2003. Die pathologische Basis: Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis. *Pharm. Unserer Zeit* 32, 368-374.

Burnette, W.N., 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.

Chevalier-Mariette, C., Henry, I., Montfort, L., Capgras, S., Forlani, S., Muschler, J., Nicolas, J.F., 2003. CpG content affects gene silencing in mice: evidence from novel transgenes. *Genome Biol.* 4, R53.

Choy, E.H., Panayi, G.S., 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 344, 907-916.

Christman,J.K., 2002. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21, 5483-5495.

Christman,J.K., Mendelsohn,N., Herzog,D., Schneiderman,N., 1983. Effect of 5-azacytidine on differentiation and DNA methylation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Cancer Res.* 43, 763-769.

Cichutek,K. Regulation of Gene Transfer Medicinal Products in Germany. Paul-Ehrlich-Institut, Langen . 2004. www.pei.de/themen/gentherapie/gene_therapy_reg.htm

Cunningham,C., Davison,A.J., 1993. A cosmid-based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. *Virology* 197, 116-124.

Daniel,M.D., Silva,D., Ma,N., 1976. Establishment of owl monkey kidney 210 cell line for virological studies. *In Vitro* 12, 290.

Desrosiers,R.C., Burghoff,R.L., Bakker,A., Kamine,J., 1984. Construction of replication-competent herpesvirus saimiri deletion mutants. *J. Virol.* 49, 343-348.

Desrosiers,R.C., Falk,L.A., 1982. Herpesvirus saimiri strain variability. *J. Virol.* 43, 352-356.

Desrosiers,R.C., Kamine,J., Bakker,A., Silva,D., Woychik,R.P., Sakai,D.D., Rottman,F.M., 1985. Synthesis of bovine growth hormone in primates by using a herpesvirus vector. *Mol. Cell Biol.* 5, 2796-2803.

DiBattista,J.A., Martel-Pelletier,J., Wosu,L.O., Sandor,T., Antakly,T., Pelletier,J.P., 1991. Glucocorticoid receptor mediated inhibition of interleukin-1 stimulated neutral metalloprotease synthesis in normal human chondrocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 72, 316-326.

Draghia-Akli,R., Malone,P.B., Hill,L.A., Ellis,K.M., Schwartz,R.J., Nordstrom,J.L., 2002. Enhanced animal growth via ligand regulated GHRH myogenic injectable vectors. *FASEB J.*

Duboise,S.M., Guo,J., Czajak,S., Desrosiers,R.C., Jung,J.U., 1998. STP and Tip are essential for herpesvirus saimiri oncogenicity. *J. Virol.* 72, 1308-1313.

DuBridge,R.B., Tang,P., Hsia,H.C., Leong,P.M., Miller,J.H., Calos,M.P., 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell Biol.* 7, 379-387.

Ensser,A., Pfänder,A., Müller-Fleckenstein,I., Fleckenstein,B., 1999. The URNA genes of herpesvirus saimiri (strain C488) are dispensable for transformation of human T cells in vitro. *J. Virol.* 73, 10551-10555.

Evans,C.H., Ghivizzani,S.C., Kang,R., Muzzonigro,T., Wasko,M.C., Herndon,J.H., Robbins,P.D., 1999. Gene therapy for rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 42, 1-16.

Feldmann,M., Brennan,F.M., Maini,R.N., 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 397-440.

Fickenscher,H., Biesinger,B., Knappe,A., Wittmann,S., Fleckenstein,B., 1996. Regulation of the herpesvirus saimiri oncogene stpC, similar to that of T-cell activation genes, in growth-transformed human T lymphocytes. *J. Virol.* 70, 6012-6019.

Firestein,G.S., 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423, 356-361.

Fleckenstein,B., Desrosiers,R.C., 1982. Herpesvirus saimiri and herpesvirus ateles. In: Roizman,B. (Ed.), *The herpesviruses*, Vol. 1. Plenum Press, New York, London, pp. 253-332.

Franz,J.K., Kolb,S.A., Hummel,K.M., Lahrtz,F., Neidhart,M., Aicher,W.K., Pap,T., Gay,R.E., Fontana,A., Gay,S., 1998. Interleukin-16, produced by synovial fibroblasts, mediates chemoattraction for CD4+ T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Eur. J Immunol* 28, 2661-2671.

Franz,J.K., Pap,T., Hummel,K.M., Nawrath,M., Aicher,W.K., Shigeyama,Y., Müller-Ladner,U., Gay,R.E., Gay,S., 2000. Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 599-607.

Friedmann,T., Roblin,R., 1972. Gene therapy for human genetic disease? *Science* 175, 949-955.

Frolova-Jones,E.A., Ensser,A., Stevenson,A.J., Kinsey,S.E., Meredith,D.M., 2000. Stable marker gene transfer into human bone marrow stromal cells and their progenitors using novel herpesvirus saimiri-based vectors. *J Hematother. Stem Cell Res.* 9, 573-581.

Gälweiler,L., Conlan,R.S., Mader,P., Palme,K., Moore,I., 2000. Technical advance: the DNA-binding activity of gal4 is inhibited by methylation of the gal4 binding site in plant chromatin. *Plant J.* 23, 143-157.

Gay,S., Gay,R.E., Koopman,W.J., 1993. Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? *Ann. Rheum. Dis.* 52 Suppl 1, S39-S47.

Gossen,M., Bujard,H., 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5547-5551.

Grassmann,R., Fleckenstein,B., 1989. Selectable recombinant herpesvirus saimiri is capable of persisting in a human T-cell line. *J. Virol.* 63, 1818-1821.

Guo,Z.S., Wang,L.H., Eisensmith,R.C., Woo,S.L., 1996. Evaluation of promoter strength for hepatic gene expression in vivo following adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther.* 3, 802-810.

Jinquan,T., Frydenberg,J., Mukaida,N., Bonde,J., Larsen,C.G., Matsushima,K., Thestrup-Pedersen,K., 1995. Recombinant human growth-regulated oncogene-alpha induces T lymphocyte chemotaxis. A process regulated via IL-8 receptors by IFN-gamma, TNF-alpha, IL-4, IL-10, and IL-13. *J. Immunol.* 155, 5359-5368.

John Wiley & Sons, I. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. Journal of Gene Medicine . 2004. www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/

Kass, S.U., Landsberger, N., Wolffe, A.P., 1997. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr. Biol.* 7, 157-165.

Katsikis, P.D., Chu, C.Q., Brennan, F.M., Maini, R.N., Feldmann, M., 1994. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 179, 1517-1527.

Keyszer, G.M., Heer, A.H., Kriegsmann, J., Geiler, T., Keysser, C., Gay, R.E., Gay, S., 1995. Detection of insulin-like growth factor I and II in synovial tissue specimens of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis by in situ hybridization. *J. Rheumatol.* 22, 275-281.

Kim, D.W., Uetsuki, T., Kaziro, Y., Yamaguchi, N., Sugano, S., 1990. Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene* 91, 217-223.

Koch, A.E., Harlow, L.A., Haines, G.K., Amento, E.P., Unemori, E.N., Wong, W.L., Pope, R.M., Ferrara, N., 1994. Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 152, 4149-4156.

Lämmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lee, D.M., Weinblatt, M.E., 2001. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 358, 903-911.

Li, L.C., Dahiya, R., 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 18, 1427-1431.

Lindsley, H.B., Smith, D.D., Cohick, C.B., Koch, A.E., Davis, L.S., 1993. Proinflammatory cytokines enhance human synoviocyte expression of functional intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Clin. Immunol. Immunopathol.* 68, 311-320.

Liote, F., Champy, R., Moenner, M., Boval-Boizard, B., Badet, J., 2003. Elevated angiogenin levels in synovial fluid from patients with inflammatory arthritis and secretion of angiogenin by cultured synovial fibroblasts. *Clin. Exp. Immunol.* 132, 163-168.

Marmorstein, R., Carey, M., Ptashne, M., Harrison, S.C., 1992. DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature* 356, 408-414.

McBurney, M.W., Sutherland, L.C., Adra, C.N., Leclair, B., Rudnicki, M.A., Jardine, K., 1991. The mouse Pgk-1 gene promoter contains an upstream activator sequence. *Nucleic Acids Res.* 19, 5755-5761.

McInnes, I.B., al Mughales, J., Field, M., Leung, B.P., Huang, F.P., Dixon, R., Sturrock, R.D., Wilkinson, P.C., Liew, F.Y., 1996. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 2, 175-182.

- Melendez,L.V., Daniel,M.D., Hunt,R.D., Garcia,F.G., 1968. An apparently new herpesvirus from primary kidney cultures of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Lab. Anim. Care* 18, 374-381.
- Müller-Ladner,U., Evans,C.H., Franklin,B.N., Roberts,C.R., Gay,R.E., Robbins,P.D., Gay,S., 1999. Gene transfer of cytokine inhibitors into human synovial fibroblasts in the SCID mouse model. *Arthritis Rheum.* 42, 490-497.
- Müller-Ladner,U., Roberts,C.R., Franklin,B.N., Gay,R.E., Robbins,P.D., Evans,C.H., Gay,S., 1997. Human IL-1Ra gene transfer into human synovial fibroblasts is chondroprotective. *J. Immunol.* 158, 3492-3498.
- Nakahara,H., Song,J., Sugimoto,M., Hagihara,K., Kishimoto,T., Yoshizaki,K., Nishimoto,N., 2003. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 1521-1529.
- Neidhart,M., Gay,R.E., Gay,S., 2000. Anti-interleukin-1 and anti-CD44 interventions producing significant inhibition of cartilage destruction in an in vitro model of cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 43, 1719-1728.
- Neumann,E., Judex,M., Kullmann,F., Grifka,J., Robbins,P.D., Pap,T., Gay,R.E., Evans,C.H., Gay,S., Scholmerich,J., Müller-Ladner,U., 2002. Inhibition of cartilage destruction by double gene transfer of IL-1Ra and IL-10 involves the activin pathway. *Gene Ther.* 9, 1508-1519.
- Oligino,T., Poliani,P.L., Wang,Y., Tsai,S.Y., O'Malley,B.W., Fink,D.J., Glorioso,J.C., 1998. Drug inducible transgene expression in brain using a herpes simplex virus vector. *Gene Ther.* 5, 491-496.
- Pear,W.S., Nolan,G.P., Scott,M.L., Baltimore,D., 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8392-8396.
- Ramezani,A., Hawley,T.S., Hawley,R.G., 2000. Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells. *Mol. Ther.* 2, 458-469.
- Richards,C.D., Langdon,C., Botelho,F., Brown,T.J., Agro,A., 1996. Oncostatin M inhibits IL-1-induced expression of IL-8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by synovial and lung fibroblasts. *J. Immunol.* 156, 343-349.
- Rollins,B.J., 1996. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol. Med. Today* 2, 198-204.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., Maniatis,T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, USA.
- Sarkar,N.N., 2002. Mifepristone: bioavailability, pharmacokinetics and use-effectiveness. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 101, 113-120.
- Schäfer,A., Lengenfelder,D., Grillhosl,C., Wieser,C., Fleckenstein,B., Ensser,A., 2003. The latency-associated nuclear antigen homolog of herpesvirus saimiri inhibits lytic virus replication. *J. Virol.* 77, 5911-5925.

Seemayer,C.A., Kuchen,S., Kuenzler,P., Rihoskova,V., Rethage,J., Aicher,W.K., Michel,B.A., Gay,R.E., Kyburz,D., Neidhart,M., Gay,S., 2003. Cartilage destruction mediated by synovial fibroblasts does not depend on proliferation in rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.* 162, 1549-1557.

Silacci,P., Dayer,J.M., Desgeorges,A., Peter,R., Manueddu,C., Guerne,P.A., 1998. Interleukin (IL)-6 and its soluble receptor induce TIMP-1 expression in synoviocytes and chondrocytes, and block IL-1-induced collagenolytic activity. *J. Biol. Chem.* 273, 13625-13629.

Simmer,B., Alt,M., Buckreus,I., Berthold,S., Fleckenstein,B., Platzer,E., Grassmann,R., 1991. Persistence of selectable herpesvirus saimiri in various human haematopoietic and epithelial cell lines. *J. Gen. Virol.* 72, 1953-1958.

Sirin,O., Park,F., 2003. Regulating gene expression using self-inactivating lentiviral vectors containing the mifepristone-inducible system. *Gene* 323, 67-77.

Spearman,C., Kärber,G., 1974. Virologische Arbeitsmethoden. In: Bibrack B,W.G. (Ed.), pp. 37-39.

Stevenson,A.J., Clarke,D., Meredith,D.M., Kinsey,S.E., Whitehouse,A., Bonifer,C., 2000a. Herpesvirus saimiri-based gene delivery vectors maintain heterologous expression throughout mouse embryonic stem cell differentiation in vitro. *Gene Ther.* 7, 464-471.

Stevenson,A.J., Cooper,M., Griffiths,J.C., Gibson,P.C., Whitehouse,A., Jones,E.F., Markham,A.F., Kinsey,S.E., Meredith,D.M., 1999. Assessment of Herpesvirus saimiri as a potential human gene therapy vector. *J. Med. Virol.* 57, 269-277.

Stevenson,A.J., Frolova-Jones,E., Hall,K.T., Kinsey,S.E., Markham,A.F., Whitehouse,A., Meredith,D.M., 2000b. A herpesvirus saimiri-based gene therapy vector with potential for use in cancer immunotherapy. *Cancer Gene Ther.* 7, 1077-1085.

Stumpf,D. Herpesvirus-saimiri-basierte Vektoren für die somatische Gentherapie der Rheumatoiden Arthritis. 2003. Medizinische Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.

Szekanecz,Z., Koch,A.E., 2001. Chemokines and angiogenesis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 13, 202-208.

Thurau,M., Whitehouse,A., Wittmann,S., Meredith,D., Fickenscher,H., 2000. Distinct transcriptional and functional properties of the R transactivator gene orf50 of the transforming herpesvirus saimiri strain C488. *Virology* 268, 167-177.

Tilg,H., Trehu,E., Atkins,M.B., Dinarello,C.A., Mier,J.W., 1994. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83, 113-118.

Tsai,S.Y., O'Malley,B.W., DeMayo,F.J., Wang,Y., Chua,S.S., 1998. A novel RU486 inducible system for the activation and repression of genes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 30, 23-31.

Valentis Inc. GeneSwitch System. Valentis Inc. 2004. www.geneswitch.com

Verma, I.M., Somia, N., 1997. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 389, 239-242.

Villiger, P.M., Terkeltaub, R., Lotz, M., 1992. Production of monocyte chemoattractant protein-1 by inflamed synovial tissue and cultured synoviocytes. *J. Immunol.* 149, 722-727.

Wahl, G.M., Lewis, K.A., Ruiz, J.C., Rothenberg, B., Zhao, J., Evans, G.A., 1987. Cosmid vectors for rapid genomic walking, restriction mapping, and gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 2160-2164.

Wang, X.J., Liefer, K.M., Tsai, S., O'Malley, B.W., Roop, D.R., 1999. Development of gene-switch transgenic mice that inducibly express transforming growth factor beta1 in the epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 8483-8488.

Wang, Y., O'Malley-BW, J., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W., 1994. A regulatory system for use in gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8180-8184.

Whalen, J.D., Lechman, E.L., Carlos, C.A., Weiss, K., Kovesdi, I., Glorioso, J.C., Robbins, P.D., Evans, C.H., 1999. Adenoviral transfer of the viral IL-10 gene periarticularly to mouse paws suppresses development of collagen-induced arthritis in both injected and uninjected paws. *J Immunol* 162, 3625-3632.

Whitehouse, A., Cooper, M., Hall, K.T., Meredith, D.M., 1998a. The open reading frame (ORF) 50a gene product regulates ORF 57 gene expression in herpesvirus saimiri. *J. Virol.* 72, 1967-1973.

Whitehouse, A., Cooper, M., Meredith, D.M., 1998b. The immediate-early gene product encoded by open reading frame 57 of herpesvirus saimiri modulates gene expression at a posttranscriptional level. *J. Virol.* 72, 857-861.

Xu, Z.L., Mizuguchi, H., Mayumi, T., Hayakawa, T., 2003. Regulated gene expression from adenovirus vectors: a systematic comparison of various inducible systems. *Gene* 309, 145-151.

IX. Publikationen

Schäfer A, Lengenfelder D, Grillhösl C, Wieser C, Fleckenstein B, Ensser A.: The latency-associated nuclear antigen homolog of *Herpesvirus saimiri* inhibits lytic virus replication. J Virol. 2003 May;77(10):5911-25

Wieser C., Stumpf D., Grillhösl C., Lengenfelder D., Gay S., Fleckenstein B., und Ensser A.: Regulated and constitutive expression of anti-inflammatory cytokines by attenuated *Herpesvirus saimiri* vectors. J. Virol., Manuskript eingereicht

Präsentationen und Poster:

Vortrag innerhalb des Kolloquiums "Methods in Molecular Virology", 2002, Erlangen: "*Herpesvirus saimiri* – Vectors for gene therapy of rheumatoid arthritis"

Posterpräsentation bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, 2002, Erlangen: „Recombinant *Herpesvirus saimiri* vectors for the therapy of inflammatory diseases“

Posterpräsentation beim Zweiten IZKF Workshop, 2002, Erlangen: „Anti-inflammatory protein expression by *Herpesvirus saimiri* vectors“

Posterpräsentation bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, 2003, Berlin: „Recombinant *Herpesvirus saimiri* vectors for the therapy of rheumatoid arthritis“

Posterpräsentation beim „First International IZKF Symposium“, 2003, Schloß Atzelsberg: „Recombinant *Herpesvirus saimiri* vectors for the therapy of rheumatoid arthritis“

Posterpräsentation beim Dritten IZKF Workshop, 2003, Erlangen: „Anti-inflammatory protein expression by *Herpesvirus saimiri* vectors“, Zweiter Platz für die beste Posterpräsentation

Posterpräsentation bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, 2004, Tübingen: „Regulated and constitutive expression of anti-inflammatory cytokines by attenuated *Herpesvirus saimiri* vectors“

X. Anhang

1. Verteilung der Zytokine der membrangebundenen Zytokindetektion

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
1	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- α
2	I-309	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
3	IL-12	IL-13	IL-15	IFN- γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1 β
4	MIP-1 δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β	TNF- α	TNF- β	EGF	IGF-I	Ang
5	OSM	Tpo	VEGF	PDGF-B	Leptin	BDNF	BLC	Ck β 8-1	Eotaxin	Eotaxin-2	Eotaxin-3
6	FGF-4	FGF-6	FGF-7	FGF-9	FIL-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
7	IGFBP-3	IGFBP-4	IL-16	IP-10	LIF	LIGHT	MCP-4	MIF	MIP-3 α	NAP-2	NT-3
8	NT-4	Osteoprotegerin	PARC	PIGF	TGF- β 2	TGF- β 3	TIMP-1	TIMP-2	Neg	Pos	Pos

2. Mögliche Interaktionspartner der exprimierten anti-inflammatorischen Interleukine in Bezug des Krankheitsgeschehens der Rheumatoiden Arthritis

Nachfolgend sind potentiell interessante Interaktionspartner von IL-1RA und IL-10, nach Angriffspunkt geordnet, beschrieben, die mit dem Krankheitsgeschehen der rheumatoiden Arthritis assoziiert sind und aus der, im Abschnitt 7.2. beschriebenen, Zytokindetektion resultieren.

Einflußfaktoren der Angiogenese

- **Angiogenin** (ANG; grüner Kreis, Zeile 4, Spalte 11)

Angiogenin wird von RASF Zellen produziert und ist an der zunehmenden Vaskularisierung der betroffenen Gelenke beteiligt. Es fördert somit indirekt die Migration von Entzündungszellen ins Gelenk und unterstützt so das Entzündungsgeschehen (Liote *et al.*, 2003).

- **Vascular endothelial growth factor** (VEGF; oranger Kreis, Zeile 5, Spalte 3)

VEGF ist ein weiterer angiogenetischer Faktor der die Migration und Proliferation von Endothelzellen, sowie das Entzündungsgeschehen der RA durch Beeinflussung der Gefäßpermeabilität unterstützt (Koch *et al.*, 1994). Eine verminderte Expression kann in synovialen Fibroblasten durch Blockade des IL-6 Rezeptors erreicht werden (Nakahara *et al.*, 2003).

Einflußfaktoren der Chemotaxis

- IL-8 (grün gestrichelter Kreis, Zeile 2, Spalte 10)

IL-8 wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und ist an der Angiogenese beteiligt (Szekanecz und Koch 2001). Seine Expression wird analog zu IL-6 durch IL-1, TNF α und IL-17 induziert. Seine Produktion erfolgt in einer Vielzahl von Zelltypen, u.a. in Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten. Es ist eine Verringerung der IL-8 Expression durch endogenes IL-10 in Kulturen von RA Synovialmembranen beschrieben (Katsikis *et al.*, 1994).

- Monocyte chemoattractant protein (MCP-1; schwarzer Kreis, Zeile 3, Spalte 5)

MCP-1 wirkt analog zu IL-8 chemotaktisch, im Gegensatz dazu jedoch nur auf Monozyten. Seine Expression in Synoviozyten wird unter anderem durch IL-1, TNF α und Oncostatin M induziert (Rollins 1996; Villiger *et al.*, 1992).

Einflußfaktoren der Zellproliferation

- Oncostatin M (OSM; blauer Kreis, Zeile 5, Spalte 1)

OSM gehört zur Familie der IL-6 Zytokine und unterstützt das Wachstum von Fibroblasten und von Zellen der glatten Gefäßmuskulatur. Es induziert die Expression von MCP-1 und IL-6 und inhibiert die Expression von IL-8 und GM-CSF (Richards *et al.*, 1996).

- Growth regulated oncogene (GRO; violetter Kreis, Zeile 1 Spalte 10)

GRO hat wachstumsfördernde und inflammatorische Eigenschaften, wirkt aber auch chemotaktisch auf T-Lymphozyten. Es wird von Fibroblasten und Synovialzellen produziert, und seine Expression wird von IL-1, TNF α und IL-6 induziert. IL-10 ist in der Lage den GRO vermittelten chemotaktischen Effekt zu inhibieren (Jinquan *et al.*, 1995)

Interleukine

- IL-1 α und IL-1 β (dunkelblaue Kreise, Zeile 2, Spalte 2 und 3)

IL-1 ist neben TNF α der Hauptmediator des Entzündungsgeschehens der rheumatoiden Arthritis (Feldmann *et al.*, 1996). Es wird neben vielen anderen Zelltypen hauptsächlich von Monozyten und Keratinozyten gebildet. Obwohl auch Fibroblasten zur Sekretion geringer IL-1 Mengen in der Lage sind, war vermutlich wegen Unterschreitung der Nachweisgrenze der Untersuchungsmethode weder IL-1 α noch IL-1 β detektierbar.

- IL-6 (grau gestrichelter Kreis, Zeile 2, Spalte 8)

IL-6 wird von vielen Zelltypen produziert, wobei die Hauptquellen aktivierte Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen sind. Die Expression wird in Fibroblasten unter anderem durch IL-1, IL-17, TNF α und virale Infektionen induziert. Es kann sowohl pro-inflammatorisch als auch anti-inflammatorisch wirken, wobei unklar ist welcher Effekt im

Rahmen der RA überwiegt. Eine Induktion der IL-1RA und TIMP-1 Expression in RASF Zellen könnte für die Therapie der RA vorteilhaft sein (Silacci *et al.*, 1998; Tilg *et al.*, 1994).

Einflußfaktoren der Knochendegradation

- Osteoprotegerin, Receptor activator of NF κ B (OPG, RANK; roter Kreis, Zeile 8, Spalte 2)
OPG ist der lösliche Rezeptor für OPGL bzw. RANKL (Receptor activator of NF κ B ligand) und blockiert die durch OPGL vermittelte Aktivierung der Osteoklastogenese. IL-1, IL-6, IL-17 und TNF α führen zu einer Induktion der OPGL Expression.

XI. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei ...

..... Herrn Prof. Dr. Bernhard Fleckenstein und PD Dr. Armin Ensser für die Überlassung eines wirklich hoch interessanten Themas. Darüber hinaus für die kontinuierliche, freundschaftliche Unterstützung, das entgegengebrachte Vertrauen und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

..... Herrn Prof. Dr. Armin Buschauer für die Bereitschaft die fakultätsinterne Vertretung dieser Dissertation zu übernehmen, was mir diese Promotion erst ermöglichte.

..... Frau Prof. Dr. Renate Gay und Herrn Prof. Dr. Steffen Gay für die Bereitstellung der RASF Zellen und die weiterführende Kooperation.

..... Doris, Elke, Christian, Frank, allen „noch“ und „nicht mehr“ „Saimiris“, sowie Steffi, Jens und Mirko. Es hat sehr viel Spaß gemacht mit Euch zusammenzuarbeiten. Wir haben viel zusammen gelacht, wodurch man über so manches nicht gelungene Experiment leichter hinwegkam.

..... meiner Mutter und meinem Bruder, die mich immerwährend unterstützt haben.

..... meinen beiden C's.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Carsten Wieser

geboren am 28.10.1973

in Nürnberg

Beruflicher Werdegang

1980 – 1982	Grundschule Erasburg
1982 – 1984	Grundschule Neumarkt-Holzheim
1984 – 1993	Willibald-Gluck-Gymnasium Neumarkt, Abschluß Abitur
1994 – 1999	Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg
2000	Approbation als Apotheker
2000 – 2004	Promotion an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut für Klinische und Molekulare Virologie
Thema:	Herpesvirus-saimiri-basierte Vektoren für die somatische Gentherapie der Rheumatoiden Arthritis
Betreuer:	PD Dr. A. Ensser / Prof. Dr. B. Fleckenstein Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg Prof. Dr. A. Buschauer Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie II, Naturwissenschaftliche Fakultät IV, Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

.....